

**Die GAL4/UAS-Methode zur gezielten Genexpression:  
eine kritische Betrachtung ihrer funktionellen Anwendung  
beim Zebrafisch, *Danio rerio***

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Nico Scheer, geb. Steinwartz**

aus Mönchengladbach

Köln 2000

Berichterstatter:

Prof. Dr. José A. Campos-Ortega

Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung:

11. Dezember 2000

## Zusammenfassung

Die Funktionsanalyse eines klonierten Zebrafisch-Gens erfolgt in der Regel durch mRNA-Injektion des Genproduktes oder einer veränderten Variante desselben. Diese Methode hat allerdings einige Nachteile. Die GAL4/UAS-Methode zur gezielten Genexpression ermöglicht es, einige dieser Nachteile zu umgehen. Um diese Methode beim Zebrafisch zu testen, wurden unterschiedliche Aktivator- bzw. Effektorlinien hergestellt. Erstere tragen das Gen des Transkriptionsaktivators GAL4 aus Hefe unter der Kontrolle eines gegebenen Promotors, während bei letzteren das zu untersuchende Gen mit der Sequenz der DNA-Bindungsstelle von GAL4 (UAS) verknüpft ist. Die Kreuzungen der meisten Aktivatoren mit Effektoren zeigen, dass die Effektorgene im räumlichen Muster der GAL4-Expression des jeweiligen Aktivators exprimiert werden, wodurch die Funktionalität der GAL4/UAS-Methode beim Zebrafisch bestätigt wird.

Durch den Gebrauch von *UAS-Notch:intra*, *UAS-her4* und *UAS-sonic hedgehog* Effektorlinien, wurden unterschiedliche Aspekte des Delta/Notch- bzw. Sonic hedgehog-Signaltransduktionsweges untersucht. Funktionelle Studien wurden durch Kreuzungen dieser Effektoren gegen einen *deltaD-GAL4* bzw. einen Hitze-induzierbaren *hsp70-GAL4* Aktivator durchgeführt. Dabei wurde die Rolle von aktiviertem Notch bei Zellschicksalsentscheidungen im Neuralrohr und in der neuralen Retina genauer analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass dieses Protein die Expression neuronaler Marker unterdrückt und die Gliogenese in beiden Organen fördert.

## Abstract

The most common way to analyze the function of cloned genes in zebrafish is to misexpress the gene product or an altered variant of it by mRNA-injection. However, mRNA-injection has several disadvantages. The GAL4-UAS system for targeted gene expression allows one to overcome some of these disadvantages. To test the GAL4-UAS system in zebrafish, we generated two different kinds of stable transgenic lines, carrying activator and effector constructs, respectively. In the activator lines the gene for the yeast transcriptional activator GAL4 is under the control of a given promoter, while in the effectors the gene of interest is fused to the sequence of the DNA-binding motif of GAL4 (UAS). Crosses of most animals from the activator and the effector lines show that effector genes are transcribed with the spatial pattern of the activators, confirming the functionality of the GAL4-UAS system in zebrafish.

By making use of *UAS-Notch:intra*, *UAS-her4* and *UAS-sonic hedgehog* effector lines, different aspects of Delta/Notch and Sonic hedgehog signalling were analyzed. Functional analysis have been performed by crossing these effectors to a *deltaD-GAL4* and a heat-inducible *hsp70-GAL4* activator, respectively. Thereby, the role of activated Notch during cell fate decisions in the spinal cord and the neural retina was analyzed in some detail. The data show, that this protein suppresses the expression of neuronal markers and promotes gliogenesis in both organs.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	9
1.1 Der Zebrafisch als Modellsystem für die Vertebratenentwicklung und Transgenese im Zebrafisch.....	10
1.2 Das GAL4-System: Eine Methode zur funktionellen Analyse entwicklungsrelevanter Gene.....	12
1.3 Der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg und dessen Bedeutung bei der Entstehung von Zelldiversität.....	15
1.3.1. Die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei der Entwicklung des Nervensystems	16
1.3.2. Die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei der Entstehung von Zelldiversität in der Retina des Wirbeltierauges	19
1.3.3. Die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei anderen Prozessen der Vertebratenentwicklung	23
1.4 Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg und dessen Bedeutung bei der Polarisierung des Nervensystems.....	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	26
<b>2. Material und Methoden</b> .....	28
2.1 Chemikalien.....	28
2.2 Puffer, Lösungen und Medien.....	29
2.3 Fischhaltung und Eiablagen.....	31
2.3.1 Haltung	31
2.3.2 Eiablage	31
2.4 Mikroinjektion.....	32
2.4.1 Reinigung der zu injizierenden DNA-Fragmente	32
2.4.2 Injektionslösung	32
2.4.3 Injektionen	32
2.4.4 Kumulative BrdU-Injektionen	33
2.5 Sichtung potentiell transgener Gründerfische und Isolierung transgener Fischlinien.....	34
2.5.1 Extraktion genomischer DNA aus F <sub>1</sub> -Embryonen und Schwanzflossen	36
2.5.2 Primer	37
2.5.3 PCR-Analysen	38
2.6 Hitzeschock von Zebrafisch-Embryonen.....	39

<b>2.7</b>	<b>Histologische Methoden.....</b>	<b>40</b>
2.7.1	Antikörperfärbungen	40
2.7.2	<i>WHOLE MOUNT</i> – <i>in situ</i> Färbungen an Embryonen	42
2.7.3	Kombinierte <i>in situ</i> Hybridisierung und Antikörperfärbung	46
2.7.4	Kombinierte BrdU-Antikörperfärbung und DNA-Färbung	47
2.7.5	X-Gal Färbungen zum Nachweis von LacZ-Aktivität	47
2.7.6	Neuromastenfärbung an lebenden Zebrafischlarven	47
<b>2.8</b>	<b>Einbettung von Embryonen und Larven.....</b>	<b>48</b>
2.8.1	Einbettung in Glycerin	48
2.8.2	Einbettung in Durcupan	48
2.8.3	Gelatine-Beschichtung von Objektträgern	49
2.8.4	Histologische Schnitte	49
<b>2.9</b>	<b>Fluoreszenz-Beobachtungen an lebenden Zebrafisch-Embryonen und –Larven.....</b>	<b>49</b>
<b>2.10</b>	<b>Plasmide.....</b>	<b>50</b>
<b>2.11</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>52</b>
2.11.1	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	52
2.11.2	Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten	52
2.11.3	Dephosphorylierung von Vektorenden	52
2.11.4	Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen	53
2.11.5	DNA-Mengenbestimmung	53
2.11.6	Ligation von DNA-Fragmenten	53
2.11.7	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	54
2.11.8	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	55
2.11.9	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	55
2.11.10	Sequenzierung von DNA-Konstrukten	55
2.11.11	Einklonieren eines synthetischen Oligonukleotides in einen Vektor	56
2.11.12	Western-Blot-Analyse	57
<b>2.12</b>	<b>Abkürzungen, Symbole und Konventionen.....</b>	<b>58</b>

<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
3.1 Herstellung stabiler transgener Insertionen.....	60
3.2 Weitervererbung der transgenen DNA.....	61
3.3 Verteilung des <i>gal4</i> -Transkriptes bei unterschiedlichen Aktivatoren.....	62
3.4 Relative Stärke der <i>gal4</i> -RNA-Expression in unterschiedlichen Aktivatoren.....	65
3.5 Nachweis der Transaktivierungsfähigkeit der unterschiedlichen Aktivatoren und Bestätigung der prinzipiellen Funktionalität des GAL4-Systems im Zebrafisch.....	67
3.6 Test der Effektoren auf Transaktivierbarkeit.....	70
3.7 Funktionsanalysen unter Verwendung des GAL4-Systems.....	75
3.7.1 Verwendete Linien bei der gezielten Expression von aktiviertem Notch	75
3.7.2 Äußerliche Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch	76
3.7.3 Genauere Analyse der Expression des Effektorgens in Kreuzungen des NIC-Effektors mit dem dID- und hsp-Aktivator	78
3.7.4 Die Expression von aktiviertem Notch in der Neuralplatte und im Neuralrohr führt zur Unterdrückung der Expression neuronaler Marker	81
3.7.5 Die Expression von aktiviertem Notch in der Neuralplatte und im Neuralrohr führt zu einer verstärkten Ausprägung von glialem Zellschicksal	85
3.7.6 Die Expression von aktiviertem Notch in der Retina führt zu einer Disorganisation der retinalen Schichtung	86
3.7.7 Die Expression von aktiviertem Notch in der Retina führt zu einer Unterdrückung von neuronaalem Zellschicksal	88
3.7.8 Die Expression von aktiviertem Notch in der Retina führt zu einer verstärkten Ausprägung von glialem Zellschicksal	90
3.7.9 Untersuchung des zeitlichen Verhältnisses der Expression von aktiviertem Notch und der Ausprägung von glialem Zellschicksal in der Retina	92
3.7.10 Auswirkungen der Expression von aktiviertem Notch auf das Proliferationsverhalten von Zellen im Neuralrohr und in der Retina	94
3.7.11 Weitere Effekte der Expression von aktiviertem Notch	97
3.7.12 Die Missexpression von <i>her4</i> mit Hilfe des hsp-Aktivators führt zu starken somitischen Defekten	101
3.7.13 Die Missexpression von <i>sonic hedgehog</i> mit Hilfe des hsp-Aktivators führt zu starken Defekten bei der Entwicklung der Augen und des Gehirns	104
3.8 Toxische Eigenschaften von GalAd1 und Gal4.....	107

<b>4. Diskussion</b> .....	109
4.1 Beim Zebrafisch können stabile transgene Insertionen mit reproduzierbarer Expression hergestellt werden.....	109
4.2 Beim Zebrafisch können stabile transgene Insertionen mit transaktivierbaren Effektorgen hergestellt werden.....	111
4.3 Das GAL4-System ermöglicht die funktionelle Analyse von Genen durch gezielte Missexpression im Zebrafisch.....	112
4.4 Möglichkeiten und Grenzen des GAL4-Systems zur Funktionsanalyse von Genen im Zebrafisch.....	112
*4.5 Verbesserungsvorschläge für das GAL4-System im Zebrafisch.....	116
4.6 Aktiviertes Notch unterdrückt die Ausprägung von neuronalem Zellschicksal bei neuronalen Vorläuferzellen des Neuralrohrs und der Retina.....	118
4.7 Aktiviertes Notch fördert die Ausprägung von glialem Zellschicksal bei neuronalen Vorläuferzellen des Neuralrohrs und der Retina.....	121
4.8 Der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg und der Zellzyklus.....	125
4.9 Die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei der Entstehung von Zelldiversität im Neuralrohr und in der Retina.....	126
4.10 Ausblick auf weiterführende Analysen unter Verwendung der hergestellten transgenen Linien.....	129
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	132
<b>6. Literatur</b> .....	134
<b>7. Anhang</b> .....	145

# 1. Einleitung

Vielzellige Organismen bestehen aus einer geordneten Ansammlung unterschiedlicher Zelltypen, die sich in ihrer Gestalt und Funktion zum Teil erheblich voneinander unterscheiden. Die Komplexität eines solchen Organismus entsteht in einer als Entwicklung bezeichneten Abfolge von Veränderungen, bei denen in fast allen Fällen eine einzelne Zelle, das befruchtete Ei, durch wiederholte Teilung sämtliche Zellen des Körpers hervorbringt. Aus dieser Tatsache leiten sich einige wesentliche Fragestellungen der Entwicklungsbiologie ab: Wie kommt diese Zelldiversität zustande, wie wird das richtige Verhältnis unterschiedlicher Zelltypen reguliert und wie wird sichergestellt, dass aus den einzelnen Komponenten ein geordnetes Muster entsteht?

Zur Beantwortung dieser Fragen hat sich die Entwicklungsbiologie traditionell auf solche Arten beschränkt, die einer entsprechenden Analyse leicht zugänglich waren und die sich im Laufe der Zeit als „Modellsysteme“ etabliert haben. Dabei zeigt sich immer deutlicher, daß sich viele der an einem Organismus gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere Arten übertragen lassen, so daß diese Erkenntnisse in der Tat einen modellhaften Charakter haben.

Beispielsweise gehört der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zu den zur Zeit entwicklungsbiologisch am besten verstandenen Organismen. Dabei hatten Arbeiten zur klonalen Beziehung und lokalen Wechselwirkung von Zellen (Sulston und Horvitz, 1977; Sulston und Horvitz, 1981; Sulston et al., 1983) eine weitreichende Bedeutung für das Verständnis von Entwicklungsprozessen im Allgemeinen.

Die systematische Erzeugung und Analyse von Entwicklungsmutanten in der Taufliege *Drosophila melanogaster* zeigte die Bedeutung des mütterlichen Beitrags bei der Ausbildung embryonaler Achsen und die Mechanismen der Musterbildung auf (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980).

Für die Untersuchung entwicklungsbiologischer Prozesse an Wirbeltieren haben traditionell Amphibien, wie der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis*, das Hühnchen *Gallus gallus* und die Hausmaus *Mus musculus* die größte Bedeutung. Jeder dieser Organismen hat seine speziellen Vorzüge und Nachteile. So eignet sich die Maus zum Beispiel hervorragend für genetische Untersuchungen, aufgrund ihrer intrauterinen Entwicklung sind die Embryonen allerdings für manipulative Eingriffe weniger geeignet. Bei Frosch und Huhn sind embryologische Manipulationen möglich, allerdings sind genetische Analysen nur schwer durchführbar. In den letzten Jahren hat der Zebrafisch *Danio rerio* als Versuchsobjekt zur Aufklärung entwicklungsbiologischer Prozesse an Bedeutung gewonnen, da er sowohl für

genetische, wie auch embryologische Studien sehr gut geeignet ist (Marcey und Nüsslein-Volhard, 1986; Kimmel, 1989; Rossant und Hopkins, 1992; Driever et al., 1994). So führten Versuche zur Herstellung von Mutanten, die Störungen in der frühen Entwicklung zeigen, zur Isolierung von tausenden solcher Entwicklungsmutanten, die ein unvergleichbares Ausgangsmaterial zur Untersuchung von Entwicklungsprozessen von Wirbeltieren darstellen (Driever, 1996; Haffter, 1996). Auswertungen dieses Materials haben das Verständnis der genetischen Grundlage der Entwicklung bei Wirbeltieren bereits deutlich erweitert.

Für die Aufklärung einer entwicklungsbiologischen Fragestellung ist neben dem Versuchsobjekt auch das Vorhandensein geeigneter Methoden von zentraler Bedeutung. Die Funktionsanalyse von Genen in der Taufliege wird beispielsweise dadurch erleichtert, daß es neben der Verfügbarkeit einer Vielzahl von Mutanten auch Techniken gibt, die die gezielte Misexpression von Genen oder deren Varianten erlauben. Eine solche Methode ist das GAL4-System (Fischer et al., 1988; Brand und Perrimon, 1993). Da es sich beim Zebrafisch noch um ein relativ junges Forschungsobjekt handelt, besteht für die Beantwortung verschiedener Fragestellungen ein Bedarf an derartigen Methoden, die für den weiteren Nutzen dieses Modellorganismus von großer Bedeutung sind.

## **1.1 Der Zebrafisch als Modellsystem für die Vertebratenentwicklung und Transgenese im Zebrafisch**

Der zur Ordnung der Teleostier (Knochenfische) gehörende Zebrafisch (*Danio rerio*) besitzt als Vertreter der niederen Wirbeltiere viele Vorzüge, die ihn zu einem geeigneten Modellorganismus für das Studium der Vertebratenentwicklung machen (Marcey und Nüsslein-Vollhard, 1986; Kimmel, 1989; Rossant und Hopkins, 1992; Driever et al., 1994). Er ist einfach und kostengünstig in großer Zahl haltbar, die Zahl der Nachkommen ist sehr groß und keinen saisonbedingten Schwankungen unterlegen. Die Befruchtung und Entwicklung erfolgt extrakorporal und die Embryonen sind fast während der gesamten Entwicklung durchsichtig, so dass eine einfache Untersuchung verschiedener entwicklungsbiologischer Vorgänge möglich ist. Die Embryonalentwicklung ist relativ kurz, da mit 72 Stunden schon alle morphologischen Merkmale des adulten Fisches ausgeprägt sind (zur Übersicht: Kimmel et al., 1995). Entwicklungsbiologische Studien sind somit schneller durchführbar als in anderen Vertebratensystemen wie *Xenopus*, Hühnchen oder Maus. Weiterhin beträgt die Generationszeit nur 8-12 Wochen, so dass der Zeitaufwand für genetische Unter-

suchungen begrenzt ist. Dies erleichterte die Herstellung und Sichtung induzierter Mutanten im großen Maßstab (Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996) und erlaubt ein effektives Arbeiten mit transgenen Organismen. Und schließlich gleichen die Entwicklungsvorgänge des Zebrafisches trotz der offensichtlichen Besonderheiten der Fisch-Entwicklung denen von anderen Vertebraten in erstaunlicher Weise (Kimmel, 1989; Eyal-Giladi, 1997). Man kann also davon ausgehen, dass viele der an diesem Organismus gewonnenen Erkenntnisse einen modellhaften Charakter für die Wirbeltier-Entwicklung haben.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Möglichkeit zur Herstellung transgener Organismen von besonderer Bedeutung. In vielen Studien wurde mittlerweile gezeigt, dass es möglich ist Fremd-DNA in das Zebrafisch-Genom einzubringen, die dann als fester Bestandteil desselben weitervererbt wird (Stuart et al., 1988; Stuart et al., 1990; Culp et al., 1991; Bayer und Campos-Ortega, 1992; Lin et al., 1994; Patil et al., 1994; Caldovic und Hackett, 1995; Higashijima et al., 1998; Scheer und Campos-Ortega, 1999; Halloran et al., 2000). Die Methode der Wahl zum Einschleusen einer ganz bestimmten DNA-Sequenz in das Genom ist dabei die Injektion der DNA in das Cytoplasma der befruchteten Eizelle. Die Rate der Integration der injizierten Fremd-DNA in das Genom schwankt bei verschiedenen Arbeitsgruppen und in Abhängigkeit von dem injizierten Konstrukt zwischen 0 und 25 %. Obwohl es mittlerweile möglich ist durch retrovirale Transformation eine deutlich höhere Insertionsfrequenz zu erreichen (Lin et al., 1994), eignet sich diese Methode zur Zeit nicht, um jede beliebige DNA-Sequenz einzubringen, da im Falle relativ großer Konstrukte der für die erfolgreiche Insertion notwendige Virustiter nicht erreicht wird (N. Gaiano, persönliche Mitteilung; T. Becker, persönliche Mitteilung). Außerdem sind für die Arbeiten mit diesen Retroviren besondere Sicherheitsvorkehrungen notwendig.

Bezüglich der Expression integrierter Fremd-DNA sind die Ergebnisse verschiedener Studien sehr unterschiedlich. Während in einigen Fällen überhaupt keine Expression nachgewiesen werden konnte (Stuart et al., 1988; Culp et al., 1991) und andere eine stark positions-abhängige Expression beobachteten (Stuart et al., 1990; Lin et al., 1994), wurde in manchen Fällen von einer nahezu positions-unabhängigen Expression berichtet (Caldovic und Hackett, 1995; Scheer und Campos-Ortega, 1999). Insbesondere die Verwendung von endogenen Zebrafisch-Promotoren führte zu sehr verlässlichen Ergebnissen bezüglich der Expression der transgenen DNA (Long et al., 1997; Higashijima et al., 1997; Halloran et al., 2000; S. Hans, persönliche Mitteilung; diese Arbeit).

## 1.2 Das GAL4-System: Eine Methode zur funktionellen Analyse entwicklungsrelevanter Gene

In jüngerer Zeit gewinnt ein als reverse Genetik bezeichneter Ansatz zur Isolation neuer Gene zunehmend an Bedeutung. Hierbei ist nicht, wie das beim klassischen Ansatz der Fall ist, eine Mutation der Ausgangspunkt der Untersuchungen, sondern die Annahme, dass ein in einem Organismus gefundenes Gen auch in anderen Arten im Verlaufe der Evolution erhalten geblieben ist. Auch wenn die zugehörigen Sequenzen mutationsbedingten Änderungen unterliegen, werden mit Hilfe moderner Techniken immer mehr Gene auf diese Art und Weise kloniert.

Desweiteren führen auch andere Ansätze zur Isolation neuer Gene. Beispielhaft seien hier die auf *in situ* Hybridisierung mit zufälligen cDNA-Sequenzen beruhenden Studien an verschiedenen Organismen genannt (Bettenhausen und Gossler, 1995; Thisse und Thisse, 1999) und die Sequenzierung ganzer Genome, die einen unmittelbaren Zugang zu kodierenden Sequenzen liefert (zur Übersicht: Osborne, 2000; Pennisi, 2000).

Ein Nachteil dieser Ansätze besteht darin, dass die auf diese Art gewonnenen Sequenzen selbst keine Informationen über die Funktion des Gens enthalten. Zwar ist es oft möglich, bestimmte Aspekte der an anderen Organismen gewonnenen Erkenntnisse auf das jeweilige Versuchsobjekt zu übertragen und Daten über die räumliche und zeitliche Verteilung der mRNA und des kodierten Genproduktes im Organismus können ebenfalls erste Hinweise auf eine mögliche Funktion geben. Um aber genauere Vorstellungen von der Bedeutung des Gens für bestimmte Entwicklungsprozesse zu bekommen bedarf es detaillierterer Funktionsanalysen.

Als besonders effizient hat sich dabei eine auf homologer Rekombination beruhende Technik in Maus herausgestellt, die das spezifische Ausschalten einer Genfunktion mit bekannter Sequenz erlaubt (Thomas und Cappechi, 1987; Kühn et al., 1995). Diese als „gene targeting“ bezeichnete Technik, bei der man sich die Möglichkeit zur gezielten Selektion entsprechender Integrationsereignisse in bei Maus verfügbaren embryonalen Stammzellen zu eigen macht, kehrt die Verhältnisse der klassischen direkten Genetik gewissermaßen um. Hier ist die Voraussetzung für das Erzeugen einer Mutation die Sequenz eines bekannten Gens, während im klassischen Fall das entsprechende Gen gerade durch die Mutation aufgedeckt wird.

Da trotz intensiver Bemühungen aus dem Zebrafisch bis heute keine Zellen isoliert werden konnten, die alle Kriterien von embryonalen Stammzellen erfüllen (C. Winkler, persönliche Mitteilung; M. Cooper, persönliche Mitteilung), ist eine vergleichbare Technik in diesem



Organismus zur Zeit nicht verfügbar. Dementsprechend hat sich die Funktionsanalyse klonierter Gene im Zebrafisch bisher auf andere Techniken gestützt. Wie in *Xenopus*, hat dabei die Missexpression zu untersuchender Gene oder Varianten derselben durch mRNA-Injektion die größte Bedeutung. Diese Methode kann relativ schnelle Erkenntnisse über die Funktion eines Gens liefern und ist besonders für die Analyse früher Entwicklungsvorgänge gut geeignet (Gurdon et al., 1974; Harvey und Melton, 1988; Kintner, 1988; Turner und Weintraub, 1994; Chitnis et al., 1995). Auf der anderen Seite hat diese Methode auch spezielle Nachteile. So wird die mRNA, die in aller Regel in ein frühes Blastomeren-Stadium injiziert wird, vom Zeitpunkt der Injektion an in allen Nachkommenzellen translatiert. Somit können komplexe Expressionsmuster mit dieser Technik nicht erzeugt werden. Die frühe Expression in allen klonal mit der injizierten Blastomere verwandten Zellen macht die Analyse eines erzeugten Phänotyps mitunter schwierig, insbesondere, wenn der Zeitpunkt der Injektion und das betrachtete Entwicklungsstadium weit auseinander liegen oder wenn das exprimierte Protein pleiotrope Funktionen bei unterschiedlichen Entwicklungsprozessen hat. Beispielhaft sei hier der weiter unten beschriebene Transmembranrezeptor Notch genannt, der sowohl in *Drosophila*, wie auch in Vertebraten bei vielen Entwicklungsvorgängen von Bedeutung ist. Insbesondere die Untersuchung der Funktion dieses Proteins bei späten Prozessen ist mittels mRNA-Injektion kaum durchführbar, da die Morphologie injizierter Embryonen schon früh gestört ist, wodurch spätere Effekte verschleiert werden (Coffman et al., 1993; diese Arbeit).

Seit neuester Zeit ist ein Hitzeschock-Promotor aus Zebrafisch verfügbar, der eine Stadium-spezifische Expression eines Proteins durch Hitzeschock von transgenen Organismen erlaubt (Halloran et al., 2000). Durch Laserstrahl-induzierte lokale Erwärmung ist es möglich, die Expression auf wenige oder sogar eine einzige Zelle zu beschränken (Halloran et al., 2000). Diese Technik wird die Untersuchung später Entwicklungsprozesse im Zebrafisch zweifelsohne erleichtern. Allerdings lassen sich auch auf diese Weise keine komplexen Expressionsmuster erzeugen. Ein weiteres Problem könnte darin bestehen, dass es aus bisher ungeklärten Gründen bei manchen Konstrukten sehr schwierig oder unmöglich ist, transgene Organismen mit diesem Promotor herzustellen (B. Thisse, persönliche Mitteilung; A. Chitnis, persönliche Mitteilung; A. Quinkertz; persönliche Mitteilung).

Eine Technik, die in *Drosophila* eine gezielte räumliche und zeitliche Expression von Genen erlaubt und sich in diesem Organismus als eine sehr effiziente Methode für deren Funktionsanalyse erwiesen hat ist das GAL4 -System (Fischer et al., 1988; Brand und Perrimon, 1993). Diese Methode macht sich die Eigenschaft des aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

stammenden Transkriptionsaktivators Gal4 zunutze, die Genexpression von einem Minimalpromotor aus zu aktivieren, wenn diesem die DNA-Bindungssequenz für das Hefe-Protein vorgeschaltet ist (Guarente et al., 1982; Kakidani und Ptashne, 1988). Bei dieser als „GAL upstream activating sequence“ (UAS) bezeichneten Bindungsstelle handelt es sich ursprünglich um ein aus vier 17 bp-Sequenzen bestehendes Element mit dyadischer Symmetrie (Giniger et al., 1985). DNA-Bindung und Transaktivierung durch Gal4 erfolgen durch zwei separate Proteindomänen (Gill und Ptashne, 1987). Das direkte Ziel für die Gal4-Aktivierungsdomäne ist offensichtlich der in Eukaryoten konservierte TATA-Bindungsfaktor TFIID (Lin et al., 1988; Horikoshi et al., 1988). Zumindest bei höheren Eukaryoten gibt es hingegen scheinbar keine zu Gal4 und UAS homologen Elemente. Das GAL4-System basiert gerade auf dieser Eigenschaft. Seine Grundidee besteht in der Herstellung zweier unterschiedlicher Klassen transgener Linien: (1) einer Aktivatorlinie, in der die kodierende Sequenz von Gal4 unter Kontrolle eines bestimmten Promoters steht und (2) einer Effektorlinie, in der die UAS-Sequenz zusammen mit einem Minimalpromotor vor ein zu untersuchendes Zielgen geschaltet ist. Erst durch Kreuzung von Aktivator- und Effektorlinie gerät das ansonsten nicht exprimierte Zielgen in der Nachkommenschaft unter die Kontrolle von Gal4 und wird in einem Muster exprimiert, das demjenigen des vor Gal4 geschalteten Promoters entspricht (Fischer et al., 1988; Ornitz et al., 1991; Brand und Perrimon, 1993).

Diese Methode hat viele Vorteile. Sie erlaubt, in Abhängigkeit von den verfügbaren Promotoren, eine gezielte, stadium- und gewebespezifische Missexpression eines zu untersuchenden Zielgens. Das in der Effektorlinie vorhandene Zielgen wird erst nach Kreuzung mit einer Aktivatorlinie exprimiert, so daß die Haltung stabiler Linien auch bei letalen oder subletalen Genprodukten problemlos möglich ist. Da es sich um ein modulares System handelt ergeben sich außerdem kombinatorische Möglichkeiten. Sind erst einmal viele Aktivator- und Effektorlinien verfügbar, so können Zielgene in einer Reihe unterschiedlicher Muster exprimiert werden, ohne das der aufwendige Weg der Herstellung neuer transgener Linien beschränkt werden muß.

In *Drosophila* wird von dieser Methode seit Jahren Gebrauch gemacht und sie hat sich hier insbesondere im Zusammenspiel mit der Analyse von Mutanten als besonders effizient erwiesen (Fischer et al., 1988; Brand und Perrimon, 1993). Auch in Maus wurde die Technik erfolgreich angewandt (Ornitz et al., 1991). In diesem Organismus wurde allerdings vergleichsweise selten von ihr Gebrauch gemacht, wahrscheinlich weil zunächst die Tendenz besteht die Funktion eines Gens durch das oben beschriebene spezifische Ausschalten einer Genfunktion zu untersuchen. Im Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass das GAL4-System

im Prinzip funktioniert (Scheer und Campos-Ortega, 1999; diese Arbeit). Funktionsanalysen mit Hilfe dieser Methode wurden bisher allerdings nicht beschrieben.

### **1.3 Der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg und dessen Bedeutung bei der Entstehung von Zelldiversität**

Eine Möglichkeit zur Erzeugung von Zelldiversität besteht darin, benachbarte Zellen durch lokale Wechselwirkung zur Ausprägung unterschiedlicher Zellschicksale zu veranlassen. Bei vielen derartigen Zellschicksalsentscheidungen scheint der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg von zentraler Bedeutung zu sein (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Im Mittelpunkt dieser auf direktem Zell-Zell-Kontakt beruhenden Wechselwirkung stehen der Rezeptor Notch (Heitzler und Simpson, 1991; Lieber et al., 1993; Rebay et al., 1993; Struhl et al., 1993) und dessen Ligand Delta (Fehon et al., 1990). Homologe dieser beiden ursprünglich in *Drosophila* gefundenen Transmembranproteine und anderer Komponenten des Transduktionsweges wurden aus einer Vielzahl so unterschiedlicher Organismen wie *Caenorhabditis* (Übersicht: Greenwald, 1998, 1994; Tax et al., 1994), Zebrafisch (Bierkamp und Campos-Ortega, 1993; Westin und Lardelli, 1997; Dornseifer et al., 1997; Appel und Eisen, 1998; Haddon et al., 1998), *Xenopus* (Coffman et al., 1990; Chitnis et al., 1995; Jen et al., 1997), Hühnchen (Henrique et al., 1995), Maus (Franco del Amo et al., 1992; Jhappan et al., 1992; Reaume et al., 1992; Lardelli und Lendahl, 1993; Lardelli et al., 1995; Williams et al., 1995; Bettenhausen et al., 1995; Dunwoodie et al., 1997), Ratte (Weinmaster et al., 1991; Weinmaster et al., 1992) und Mensch (Ellisen et al., 1991; Joutel et al., 1996) kloniert, wobei die grundsätzlichen Strukturmerkmale der Proteine konserviert sind. Im Zebrafisch wurden bisher vier verschiedene Notch-Homologe (Bierkamp und Campos-Ortega, 1993; Westin und Lardelli, 1997) und vier Delta-Homologe (Dornseifer et al., 1997; Appel und Eisen, 1998; Haddon et al., 1998) gefunden, die unterschiedliche und zum Teil überlappende Expressionsmuster aufweisen, die deren Beteiligung bei einer Vielzahl von Zellschicksalsentscheidungen in den unterschiedlichsten Geweben möglich erscheinen lassen. Die Konservierung der Proteine des Signaltransduktionsweges legt auch ähnliche Mechanismen bei Zellschicksalsentscheidungen in unterschiedlichen Organismen nahe. Dies konnte am Beispiel bestimmter Aspekte der Neurogenese gezeigt werden.

### 1.3.1. Die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei der Entwicklung des Nervensystems

Eine Beteiligung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei der Entstehung des Nervensystems wurde ursprünglich in *Drosophila* festgestellt (Übersicht: Campos-Ortega, 1993). Hier bildet sich das Zentralnervensystem (ZNS) durch Proliferation von Vorläuferzellen (Neuroblasten), die aus der Region des ventralen und procephalen Neuroektoderms in mehreren Wellen ins Innere des Embryos zwischen Meso- und Ektoderm segregieren. Dabei werden die verbleibenden Zellen des Neuroektoderms zu Epidermoblasten (Hartenstein und Campos-Ortega, 1984; Hartenstein und Campos-Ortega, 1985; Technau und Campos-Ortega, 1985; Doe, 1992; Übersicht: Campos-Ortega, 1993). Die Aufklärung der genetischen Grundlage des Entscheidungsprozesses zwischen epidermalem und neuralem Schicksal wurde durch die Verfügbarkeit vieler neuraler Mutanten erleichtert. Diese zeigen zwei gegensätzliche Arten phänotypischer Ausprägung, die zur Einteilung der betroffenen Sequenzen in zwei Gen-Gruppen führten:

- Eine Minderausprägung (Hypoplasie) des Nervensystems (NS) wird durch eine Ausfallmutation in einem proneuralen Gen hervorgerufen (Jimenez und Campos-Ortega, 1979; Ghysen und Dambly-Chaudier, 1989). Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind die Gene des *Achaete-Scute*-Komplexes (AS-C) (Ghysen und Dambly-Chaudier, 1988) und *atonk* (Jarman et al., 1995), die für Transkriptionsfaktoren mit einem basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Motiv kodieren.
- Eine Überausprägung (Hyperplasie) des NS auf Kosten von epidermalen Zellen wird durch eine Ausfallmutation eines „neurogenen Gens“ ausgelöst (Lehmann et al., 1981). Dazu gehören neben den bereits beschriebenen Genen für die Transmembranproteine Notch und Delta, jene des *Enhancer of split*-Komplexes (E(spl)-C) (Knust et al., 1987a, 1987b, 1992), *groucho* (Hartley et al., 1988; Preiss et al., 1988), *mastermind* (Smoller et al., 1990), *neuralized* (Boulianne et al., 1991) und *big brain* (de la Concha et al., 1988).

Offensichtlich sind die proneuralen und neurogenen Gene also notwendig, um richtiges Verhältnis neuraler und epidermaler Zellen zu gewährleisten. Diese Verhältnismäßigkeit wird durch einen Prozess lokaler Wechselwirkungen sichergestellt, der benachbarte Zellen daran hindert gleiche Zellschicksale anzunehmen und der als „laterale Inhibition“ bezeichnet wird. Dabei sind die beiden Gengruppen in einem komplexen funktionellen Netzwerk miteinander verknüpft (Übersicht: Campos-Ortega, 1993). Die Selektion der Neuroblasten erfolgt

innerhalb wenige Zellen umfassender Äquivalenzgruppen, die sich durch die Expression proneuraler Gene auszeichnen. Alle Zellen eines solchen „proneuralen Clusters“ besitzen zunächst die Kompetenz einen Neuroblasten zu bilden (Cabrera et al., 1987). Im Laufe der Neurogenese akkumuliert eine Zelle eines Clusters allerdings mehr proneurales Genprodukt als ihre Nachbarn und entwickelt sich zum Neuroblasten. Umliegende Zellen werden durch die Wirkung der neurogenen Gene, die ein Abschalten der Expression proneuraler Gene in diesen Zellen bewirken, an der Ausprägung des selben Schicksals gehindert (Kunisch et al., 1994). Dabei präsentiert der Neuroblast auf seiner Oberfläche verstärkt das Transmembranprotein Delta (Heitzler und Simpson, 1991), was nach der vorherrschenden Meinung zu einer Modifikation von dessen Rezeptor Notch in benachbarten Zellen führt (Schroeter et al., 1998; Lecourtois und Schweisguth, 1998). Diese Modifikation bewirkt eine Translokation der intrazellulären Domäne des Rezeptors in den Zellkern (Schroeter et al., 1998; Lecourtois und Schweisguth, 1998), wo diese im Zusammenspiel mit dem DNA-bindenden Protein Suppressor of Hairless (Su(H)) (Schweisguth und Posakony, 1992) eine Aktivierung von Genen des *E(spl)*-Komplexes veranlaßt (Jennings et al., 1994). Poteindimere der Genprodukte des *E(spl)*-C mit dem Kofaktor Groucho führen zu einer Repression der proneuralen Genaktivität (Schrons et al., 1992; Paroushet et al., 1994; Oellers et al., 1994; Tata und Hartley, 1995; Heitzler et al., 1996; Nakao und Campos-Ortega, 1996). Da die proneuralen Proteine ihrerseits als Transkriptionsaktivatoren des neurogenen Gens *delta* fungieren, handelt es sich bei dem Prozess der lateralen Inhibition um einen sich selbst verstärkenden Vorgang mit positiver Rückkoppelung (Haenlin et al., 1994; Hinz et al., 1994; Kramatschek und Campos-Ortega, 1994; Kunisch et al., 1994; Singson et al., 1994). Molekular lässt sich dieser Vorgang als Expressions- bzw Aktivitätsungleichgewicht der neurogenen Proteine Delta und Notch in zwei benachbarten Zellen verstehen.

Im Gegensatz zur Tauflye entwickelt sich das ZNS von Wirbeltieren nicht durch die Segregation einzelner Zellen, sondern durch das Einfalten einer kohärenten Zellschicht des dorsalen Ektoderms. Diesem Prozess, der zur Trennung von der den Keim umhüllenden Epidermis und dem Neuralrohr führt, gehen Induktionsprozesse voraus, in deren Verlauf das dorsale Ektoderm neurale Kompetenz erhält und sich zur Neuralplatte entwickelt (Übersicht: Jessell und Lumsden, 1997). Einen entscheidenden Beitrag bei diesen Induktionsprozessen liefert dabei das dem Organisator entstammende dorsale Mesoderm (Harland, 1997).

An der Regionalisierung der Neuralplatte und des Neuralrohrs ist das Mesoderm ebenfalls beteiligt. So scheinen es vornehmlich Signale aus dem Mesoderm zu sein, die den verschiedenen Regionen des Neuralrohrs eine ihrer jeweiligen Position entsprechende Identität entlang der

anterior-posterioren Achse geben (zur Übersicht: Jessell und Lumsden, 1997). Auch entlang der dorso-ventralen Achse hat das Neuralrohr eine polarisierte Gliederung. Beispielsweise haben die drei wichtigsten neuronalen Zelltypen im Neuralrohr (sensorische Neurone, Inter- und Motorneurone) immer eine feste Position zueinander. Während sensorische Neurone die dorsalste und Motorneurone die ventralste Position einnehmen, bilden sich Interneurone zwischen diesen beiden Zelltypen. Die Mechanismen, die zur Polarisierung des Neuralrohrs entlang der dorso-ventralen Achse führen werden in Kapitel 1.4 näher erklärt.

Untersuchungen zur Regulation der Entstehung einzelner neuronaler Zelltypen haben sich bisher hauptsächlich auf die Bildung früher Zellarten beschränkt. Ein solcher Zelltyp sind die primären Motorneurone. Sie sind einer Untersuchung besonders gut zugänglich, da es sich hierbei um eine der sich am frühesten differenzierenden Neurone überhaupt handelt, sie sehr einfach organisiert, in ihrer Morphologie gut von anderen Zelltypen unterscheidbar und durch geeignete Marker direkt ansprechbar sind (zur Übersicht: Pfaff und Kintner, 1998; Eisen, 1999). Ein häufig verwendeter Marker dieser Art ist das LIM-Homeodomän Protein Islet-1 (Ericson et al., 1992; Inoue et al., 1994; Korzh et al., 1993).

Obwohl sich die Art der Bildung des Nervensystems bei Wirbeltieren deutlich von der bei *Drosophila* unterscheidet, scheinen doch ähnliche Mechanismen bei der Spezifizierung neuronaler Zelltypen beteiligt zu sein. So haben mittlerweile eine ganze Reihe von Studien gezeigt, daß proneurale Proteine und der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg für die Bildung von primären Neuronen von Bedeutung sind. Ähnlich wie in *Drosophila* konnte auch für bestimmte Neurone von Wirbeltieren gezeigt werden, dass deren Entstehung von proneuralen Genen reguliert wird (Turner und Weintraub, 1994; Allende und Weinberg, 1994; Ma et al., 1996; Chitnis und Kintner, 1996; Henrique et al., 1997)

Versuche an *Xenopus* haben außerdem bestätigt, daß neurale Vorläuferzellen negativ durch die laterale Inhibition reguliert werden (Chitnis et al., 1995). Weiterhin wird *X-delta-1* in der Neuralplatte zum Zeitpunkt der Entstehung des primären Nervensystems exprimiert und dessen Expression durch proneurale Gene induziert (Chitnis und Kintner, 1996; Ma et al., 1996). Die Erhöhung der Delta-Aktivität führt zu einer Verminderung, die Inhibition zu einer Vermehrung primärer Neurone und die Missexpression einer konstitutiv aktiven Variante des Rezeptors Notch hat gleichermaßen eine Verminderung primärer Neurone zu Folge (Chitnis et al., 1995). Ähnlich wie bei *Drosophila* führt die intrazelluläre Weiterleitung des lateral inhibierenden Signals bei *Xenopus* über ein Suppressor of Hairless-Homolog zur Aktivierung nachgeschalteter *E(spl)*-homologen Gene (Wettstein et al., 1997).

Diese ursprünglich durch Missexpression bestimmter mRNAs in *Xenopus* erzielten Ergebnisse, wurden durch Ausfallmutationen in neurogenen und proneuralen Genen in Maus untermauert (de la Pompa et al., 1997; Ishibashi et al., 1995; Fode et al., 1998). Auch im Zebrafisch wurden mittlerweile Untersuchungen durchgeführt, die die Tatsache belegen, dass ähnliche Mechanismen bei der Spezifizierung neuronaler Zellen wirken wie in *Drosophila*. Beispielsweise sind auch in diesem Organismus proneurale Gene für die Entstehung bestimmter neuronaler Zellen notwendig (Allende und Weinberg, 1994; Blader et al., 1997) und weiterhin ist der Mechanismus der lateralen Inhibition an der Spezifizierung primärer Neurone beteiligt (Dornseifer et al., 1997; Appel et al., 1998; Haddon et al., 1998; Takke et al., 1999; Holley et al., 2000). Takke et al. konnten ferner zeigen, dass *her4*, ein *hairy/enhancer of split*-Homolog positiv von Notch reguliert wird und dass es im Zebrafisch eine ähnliche, auf lateraler Inhibition beruhende Rückkoppelungs-Schleife bei der Entstehung primärer Motoneurone gibt, wie es für das Auswählen von Neuroblasten aus dem ventralen Ektoderm von *Drosophila* gezeigt wurde (Takke et al., 1999).

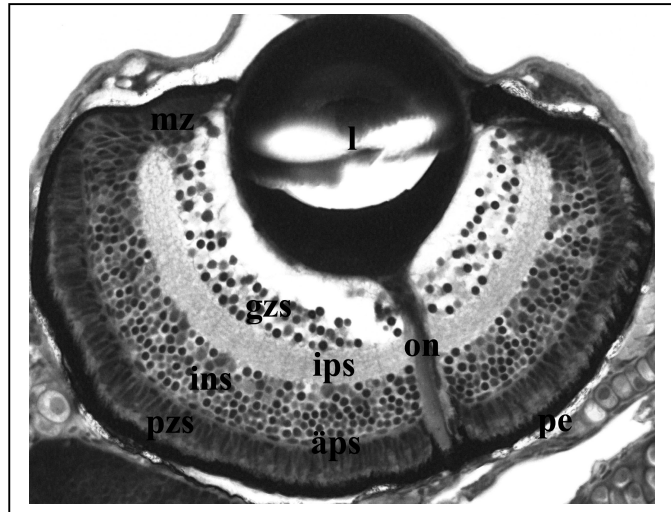
Während sich die meisten bisherigen Studien auf die entstehenden Neurone beschränkt haben, wurde das Schicksal der von der lateralen Inhibition an der neuronalen Differenzierung gehinderten Zellen nicht genauer untersucht. In *Drosophila* werden Zellen, die nach mehreren Segregationswellen kein neurales Schicksal angenommen haben zu Epidermoblasten. Bei Wirbeltieren wurde vermutet, dass diejenigen Zellen die benachbart zu sich differenzierenden Neuronen liegen durch die Aktivierung von Notch an der Differenzierung gehindert werden und somit spätere Zellschicksale, wie z.B. sekundäre Motoneurone ausprägen können (Coffman et al., 1993; Henrique et al., 1995; Chitnis et al., 1995; Appel et al., 1998). Im Vorderhirn von Mäusen bewirkt die Expression von aktiviertem Notch allerdings eine Zellschicksalsentscheidung neuronaler Vorläuferzellen zugunsten von Gliazell-Differenzierung (Gaiano et al., 2000; siehe auch nächstes Kapitel).

### **1.3.2. Die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei der Entstehung von Zelldiversität in der Retina des Wirbeltierauges**

Das Wirbeltierauge entsteht durch komplexe Wechselwirkungen von Teilen des anterioren Neuralrohrs mit dem darüberliegenden Kopfektoderm, in deren Verlauf die dem Ektoderm entstammende Linse und die neurale Retina eine geordnete Struktur bilden. Entsprechend ihrer Funktion, die durch die Linse einfallenden Lichtstrahlen in elektrische Impulse umzuwandeln und diese Reize in die nachgeschalteten Zentren des Gehirns weiterzuleiten, hat

die Retina eine sehr spezifische Strukturierung, die bei allen bisher untersuchten Wirbeltieren nahezu identisch ist (Abb.1.1.) (Müller, 1857; Cajal, 1893).

**Abb. 1.1:** Transversaler Schnitt durch ein Auge einer 2 Tage alten Zebrafischlarve. Dorsal ist links. **äps:** äußere plexiforme Schicht; **gzs:** Ganglionzellschicht; **ins:** innere nukleäre Schicht; **ips:** innere plexiforme Schicht; **l:** Linse; **mz:** marginale Zone; **on:** optischer Nerv; **pe:** Pigmentepithelium; **pzs:** Photorezeptorzellschicht



Sie besteht aus drei nukleären Schichten, in denen sich die Zellkörper von sechs unterschiedlichen neuronalen und einem glialen Zelltyp befinden (Cepko et al., 1996; Harris, 1997). Die Umwandlung der Lichtreize in elektrische Signale erfolgt in der Schicht der Photorezeptoren, in der sich mit den Stäbchen und Zapfen zwei Gruppen neuronaler Zellen befinden. In der inneren nukleären Schicht werden die elektrischen Reize weitergeleitet und teilweise verarbeitet. Diese Schicht enthält die Perikarya von drei neuronalen Zelltypen (Amakrin-, Bipolar- und Horizontalzellen) und einen glialen Zelltyp (Müllerzellen). Die endgültige Weiterleitung des Signals in die nachgeschalteten Zentren erfolgt durch die in der Ganglionzellschicht gelegenen Ganglionzellen, deren langen Axone sich zum optischen Nerv bündeln. Zwischen den drei nukleären befinden sich zwei plexiforme Schichten, in denen die für die Reizweiterleitung notwendigen Verbindungen der unterschiedlichen Zelltypen geknüpft werden. Weiterhin gibt es bei Fischen und Amphibien eine an den äußeren Rändern der Retina befindliche Region undifferenzierter Zellen, von der aus neue Zellen zu den bestehenden Schichten hinzugefügt werden. Im Gegensatz zu Säugetieren dauert die Neurogenese bei Teleostern und larvalen Amphibien in dieser Marginalzone während des ganzen Lebens an (Malicki, 1999). Die Schicht der Photorezeptoren ist von einem Pigmentepithelium umgeben, in das die äußeren Segmente der Rezeptoren eingebettet sind und das den weiteren durchtritt des Lichtes ins Innere des Organismus verhindert.

Die anfängliche Schichtung der Retina entsteht in einer sukzessiven Abfolge von Differenzierungsschritten der unterschiedlichen Zelltypen. Bei den meisten Wirbeltieren, werden die Ganglionzellen als erste Zellen der neuronalen Retina postmitotisch (Nawrocki,



1985). Die ersten postmitotischen Zellen in der Schicht der Ganglionzellen beobachtet man beim Zebrafisch bei ca. 28 Stunden nach der Befruchtung (Nawrocki, 1985; Hu und Easter, 1999). In der inneren nukleären sind Schicht die ersten postmitotischen Zellen ab ca. 38 Stunden nachweisbar (Hu und Easter, 1999) und bei ca. 48 Stunden werden die ersten postmitotischen Photorezeptoren sichtbar (Nawrocki, 1985; Larison und Bremiller, 1990; Raymond et al., 1995; Hu und Easter, 1999). Mit 60 Stunden sind über 90 % der Neurone der zentralen Retina postmitotisch und die verschiedenen Schichten dieses Gewebes sind morphologisch unterscheidbar (Malicki, 1999).

Offensichtlich vollzieht sich die Etablierung dieser Schichtung und die Differenzierung der unterschiedlichen Zellen in der Zebrafisch-Retina in einem sehr kurzen Zeitfenster und es gibt deutliche Überlappungen in den Zeitabschnitten der Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen (Nawrocki, 1985). Dies ist ähnlich wie bei *Xenopus*, aber anders als bei Nagern, wo die Neurogenese unterschiedlicher Zelltypen zeitlich kaum überlappt (Young, 1985; Holt et al., 1988). Dennoch läßt sich auch bei Zebrafisch und *Xenopus* für jeden Zelltyp ein Zeitraum bestimmen, in dem vorwiegend Zellen dieses Typs gebildet werden (Harris, 1997; Hu und Easter, 1999). Dabei scheint die relative Abfolge der Entstehung der unterschiedlichen Zelltypen zwischen verschiedenen Arten weitgehend konserviert zu sein. So entstehen Ganglionzellen zu Beginn und Stäbchen und Müllersche Gliazellen gegen Ende der Entwicklung der Retina. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß multipotente Vorläuferzellen bis relativ spät in der Entwicklung alle unterschiedlichen Zelltypen der Retina bilden können (Wetts und Fraser, 1988). Entsprechend bilden klonal verwandte Zellen stets eine lineare, alle Schichten der Retina durchkreuzende Abfolge (Turner und Cepko, 1987). Da weder die Abstammung der Zelle, noch der Zeitpunkt ihrer Geburt an sich für ihr Schicksal ausschlaggebend zu sein scheinen (Holt et al., 1988; Belecky-Adams et al., 1996), werden im wesentlichen zwei Mechanismen für die Erzeugung von Zelldiversität im Auge verantwortlich gemacht. Zum einen scheint die zeitliche Abfolge der Entstehung unterschiedlicher Zelltypen von Wachstumsfaktoren abhängig zu sein, deren Aktivität ihrerseits zeitlich reguliert ist (zur Übersicht: Harris, 1997). Desweiteren sind lokale Zell-Zell-Wechselwirkungen an den Zellschicksals-Entscheidungen beteiligt.

Wie für das Rückenmark ist die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei diesen Prozessen in zahlreichen Studien an verschiedenen Organismen nachgewiesen worden. Dabei wurde für *Xenopus*, Hühnchen und Maus beschrieben, daß die Funktion von aktiviertem Notch in einer Unterdrückung jeglicher Differenzierung von retinalen Zellen besteht (Dorsky et al., 1995; Tomita et al., 1996; Henrique et al., 1997). Umgekehrt führte die

Unterdrückung von Notch-Aktivität zur vorzeitigen Differenzierung von Zellen im Auge, was sich durch eine Überproduktion früher Schicksale, wie zum Beispiel Ganglion Zellen nachweisen ließ (Tomita et al., 1996; Ahmad et al., 1997; Dorsky et al., 1997; Henrique et al., 1997). Aus diesen Beobachtungen wurde ein Modell abgeleitet, wonach die Aktivierung von Notch Zellen an der Differenzierung hindert, so dass diese in der Lage sind spätere Schicksale anzunehmen (Dorsky et al., 1995; Dorsky et al., 1997; Henrique et al., 1997). Dementsprechend wäre Notch nicht direkt an der Ausprägung eines Zellschicksals beteiligt, sondern würde nur eine Gruppe von Zellen zur Verfügung stellen, auf die die eigentlichen Induktoren eines Zellschicksals zum jeweils richtigen Zeitpunkt wirken können. Eine vergleichbare Funktion wurde Notch auch bei anderen Prozessen der Zelldiversivikation nachgesagt (Coffman et al., 1993).

Vereinzelt wurde auch berichtet, daß der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg zusätzlich einen Einfluß auf das Teilungsverhalten von Zellen hat (Ishibashi et al., 1995; Henrique et al., 1997; Furukawa et al., 2000). So wurde am Hühnchen gezeigt, daß Zellen die benachbart zu Deltalike1 (Dll1)-exprimierenden Zellen liegen und in denen somit der Notch-Transduktionsweg aktiviert wird, nicht nur an der Differenzierung gehindert werden, sondern auch stärker proliferieren als Kontrollzellen. Umgekehrt, verläßt ein Großteil von Zellen, die in einem Fleck von Zellen liegen die dominant negatives Dll1 exprimieren den Zellzyklus vorzeitig (Henrique et al., 1997). Dies führte zu der Spekulation, dass der Notch-Signaltransduktionsweg nicht nur undifferenzierte, sondern auch proliferierende Zellen bereit stellt, die eine Art Stammzellcharakter haben sollen (Henrique et al., 1997; Gaiano, 2000).

In letzter Zeit mehren sich allerdings die Hinweise, dass die Aktivierung von Notch eine direktere Auswirkung auf Zellschicksalsentscheidungen haben könnte. Nye et al. konnten zeigen, dass Notch zwar die Neurogenese und Myogenese, aber nicht die gliale Differenzierung von Säugerzellen unterdrücken kann (Nye et al., 1994). An Ratten wurde gezeigt, dass das Genprodukt des proneuralen Gens *neuroD* (Lee et al., 1995; Naya et al., 1995), ein kritischer Regulator der Entscheidung von neuronalem gegenüber glialem Schicksal in der Retina ist (Morrow et al., 1999). Untersuchungen am gleichen Organismus führten zu dem Ergebnis, dass Notch1 und Hes1 die Bildung von Müllerschen Gliazellen von postnatalen retinalen Vorläuferzellen fördert (Furukawa et al., 2000), während Notch1 neuronales Zellschicksal unterdrückt (Bao und Cepko, 1997). Weiterhin wurde beschrieben, dass Hes5 spezifisch in sich entwickelnden Gliazellen der Maus-Retina exprimiert wird und dass die Misexpression dieses Gens neuronale Vorläuferzellen in ein gliales Schicksal führt (Hojo et al., 2000). Auch für Neuralleisten Stammzellen aus Ratten und Maus-Vorderhirn-

Zellen wurde mittlerweile gezeigt, das aktiviertes Notch eine Glialisierung neuronaler Vorläuferzellen bewirken kann (Morrison et al., 2000; Gaiano et al., 2000).

Im Zebrafisch konnte gezeigt werden, daß *notch1a* und verschiedene *delta*-Homologe, darunter auch *deltaD* in der sich entwickelnden Retina exprimiert werden (Bierkamp und Campos-Ortega, 1993; Dornseifer et al., 1997; Smithers et al., 2000), so daß eine Beteiligung dieses Transduktionsweges an Zellschicksals-Entscheidungen auch hier sehr wahrscheinlich ist. Allerdings sind in diesem Organismus bisher keine funktionellen Daten dazu bekannt.

### **1.3.3. Die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei anderen Prozessen der Vertebratenentwicklung**

Wie bei *Drosophila* ist die Funktion des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei Vertebraten nicht nur auf Zellschicksalsentscheidungen während der Neurogenese beschränkt. So konnten Kopan et al. zeigen, dass dieser Transduktionsweg auch für die Myogenese von Bedeutung ist (Kopan, 1993). Desweiteren sind verschiedene Mitglieder der Kaskade an der Bildung der Somitengrenzen beteiligt (zur Übersicht: Gossler und Hrabe de Angelis, 1998). Untersuchungen von Appel et al. legen eine Funktion des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei Zellschicksalsentscheidungen zwischen Notochord-, Hypochord- und Bodenplatten-Vorläuferzellen nahe (Appel et al., 1999; siehe auch Kapitel 1.2.). Und auch bei einer ganzen Reihe anderer Prozesse wie der Hämatopoese (Porcher et al., 1996) und der Ausbildung von Haarfollikeln (Kopan und Weintraub, 1993) sind Mitglieder des Transduktionsweges beteiligt, was die pleiotrope Bedeutung dieser Kaskade bestätigt.

## **1.4 Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg und dessen Bedeutung bei der Polarisierung des Nervensystems**

Das Gen *hedgehog* wurde ursprünglich in *Drosophila* entdeckt (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980), wo es bei der Segmentierung und der Musterbildung in den Imaginalscheiben von entscheidender Bedeutung ist. Während in der Taufliede und anderen Invertebraten nur ein *hedgehog* Gen gefunden wurde, sind bei Wirbeltieren mehrere Vertreter dieser Genfamilie identifiziert worden. Aus Maus sind beispielsweise die Vertreter *sonic hedgehog* (*shh*), *desert hedgehog* (*dhh*) und *indian hedgehog* (*ihh*) (Echelard et al., 1993) bekannt, während im Zebrafisch bisher *sonic hedgehog* (*shh*) (Krauss et al., 1993), *echidna*

*hedgehog (ehh)* (Currie und Ingham, 1996) und *tiggy-winkle hedgehog (twhh)* (Ekker et al., 1995) kloniert wurden.

Offensichtlich wirken alle Hedgehog-Homologe über einen ähnlichen Transduktionsweg. Es handelt sich um sekretierte Signalmoleküle, wobei wahrscheinlich alle biologisch aktiven Hedgehog-Peptide durch eine von Cholesterin abhängige Selbstspaltung eines größeren Vorläuferproteins hergestellt werden (Lee et al., 1994; Porter et al., 1995; zur Übersicht: Hammerschmidt et al., 1997). Dadurch entsteht ein 19 kDa großes N-terminales und ein 26-28 kDa großes C-terminales Peptid (Lee et al., 1992; Chang et al., 1994; Lee et al., 1994; Bumcrot et al., 1995; Porter et al., 1995; Ekker et al., 1995). Das N-terminale Peptid ist nötig und ausreichend, um die kurz- und weit-reichenden Signalaktivitäten der Hedgehog-Proteine zu gewährleisten (Porter et al., 1995; Ekker et al., 1995; Roelink et al., 1995; Porter et al., 1996; Fietz et al., 1995; Marti et al., 1995; Lopez-Martinez et al., 1995; Ekker et al., 1995). Auf der Oberfläche einer kompetenten Zelle bindet dieses Peptid an einen aus den beiden Transmembranproteinen Patched (Ptc) und Smoothened (Smo) bestehenden Rezeptorkomplex, wodurch Smo der inhibierenden Aktivität von Ptc entbunden wird. Dies führt zu einer intrazellulären Transduktionskaskade an deren Ende eine ungespaltene Form des *Drosophila* Proteins Cubitus interruptus (Ci) bzw. von dessen Homologen in den Zellkern transportiert werden, um dort die Transkriptionsaktivierung von Zielgenen zu ermöglichen. Ohne die Aktivierung von Smo durch Hh ist Ci an die Mikrotubuli der Zelle gebunden. In dieser Form ist es einer Spaltung zugänglich, wodurch ein Peptid entsteht, das als Repressor der Gene fungiert, deren Transkription von ungespaltenem CI aktiviert wird.

Bei Wirbeltieren spielt der Hedgehog-Signaltransduktionsweg bei so unterschiedlichen Prozessen wie der Kontrolle der Rechts-Links Asymmetrie, der Polarität des Nervensystems, der Somiten und der Gliedmaßen, der Chondrogenese, Spermatogenese und Myogenese und vielen anderen Prozessen eine wichtige Rolle (zur Übersicht: Gilbert, 2000). Insbesondere dessen Funktion bei der dorso-ventralen Musterbildung des Nervensystems wurde in den letzten Jahren eingehend untersucht. Bei diesem Prozess scheint das Gen *shh* von entscheidender Bedeutung zu sein.

Wie schon in Kapitel 1.1.1. beschrieben, ist das Neuralrohr von Wirbeltieren entlang seiner dorso-ventralen Achse stark polarisiert. Diese Polarität, mit sensorischen Neuronen im dorsalen, Motorneuronen im ventralen und Interneuronen im dazwischenliegenden Bereich, wird wahrscheinlich von Signalen induziert, die aus der unmittelbaren Nachbarschaft des Neuralrohrs stammen. Demnach ist die dorsale Musterbildung von Signalen der TGF- $\beta$  Superfamilie aus der Epidermis und die ventrale Musterbildung unter anderen von Hh-

Signalen aus dem Notochord abhängig (Zur Übersicht: Tanabe und Jessell, 1996; Jessell und Lumsden, 1997). Inwieweit kooperative Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Signalwegen einen Einfluß auf die Musterbildung haben ist Gegenstand momentaner Diskussionen (Jessell und Lumsden, 1997; Barth et al., 1999).

Nach der vorherrschenden Meinung führt die Sekretion von Shh aus dem Notochord zu einer Induktion von Bodenplattenzellen in dem darüberliegenden medio-ventralsten Teil des Neuralrohrs (Placzek et al., 1990; Yamada et al., 1991, 1993; Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994). Allerdings sollte betont werden, dass in letzter Zeit zunehmend Zweifel an der Bedeutung dieses frühen Induktionsprozesses geäußert werden. So konnten Teillet et al. zeigen, dass Bodenplattenzellen auch in völliger Abwesenheit von Notochord entstehen können (Teillet et al., 1998). Auch bei Mutanten im Zebrafisch, denen ein Notochord fehlt, ist die Bildung von Bodenplattenzellen nicht unterdrückt (Halpern et al., 1997). Durch die Analyse von Doppelmутanten von *ntl* und *cyc* kamen Halpern et al. zu dem Schluß, dass das Ntl-Protein in gemeinsamen Vorläuferzellen die Ausbildung von Notochordschicksal fördert und von Bodenplattenschicksal unterdrückt (Halpern et al., 1997). Weiterhin konnten Schauerte et al. zeigen, daß Shh im Zebrafisch weder notwendig noch ausreichend ist, um die Bildung von medialen Bodenplattenzellen zu induzieren (Schauerte et al., 1998). So bilden sich in der *shh*-Mutante *syu* Bodenplattezellen und die Misexpression von Shh induziert keine ektopischen medialen Bodenplattezellen. Nach Ansicht dieser Autoren werden die medialen Bodenplattenzellen nicht durch irgendein Hh Molekül induziert, sondern sie entstehen durch sehr frühe Zellschicksalsentscheidungen in gemeinsamen Vorläuferzellen der Bodenplatte, des Notochords und des endodermalen Hypochords im Organisator (Teillet et al., 1998; Halpern et al., 1997; Schauerte et al., 1998). Diese Vorstellung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in einer Zebrafisch *deltaA*-Mutante das Notochord stark vergrößert ist, während die Bodenplatte und das Hypochord weitgehend fehlt (Appel et al., 1999). Diese Autoren spekulieren, dass die von Anderen vorgeschlagenen Zellschicksalsentscheidungen im Organisator, durch einen Delta/Notch-abhängigen Mechanismus verwirklicht werden (Appel et al., 1999).

Wie auch immer die Identität von Bodenplattenzellen zustande kommt, so äußert sich deren Etablierung in der Expression und Sekretion von Shh, wodurch ein von ventral nach dorsal abfallender Gradient im Neuralrohr entsteht. Die unterschiedlichen Konzentrationen von Shh veranlassen die Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zellen entlang der dorso-ventralen Achse des Neuralrohrs, was zur Ausprägung unterschiedlicher Zellschicksale führt (Roelink et al., 1995; Tanabe et al., 1995; Briscoe et al., 1999).

Außerdem wird die Expression von Genen, die für die Ausprägung dorsaler Zellschicksale verantwortlich sind, wahrscheinlich von Shh unterdrückt (Goulding et al., 1993; Liem et al., 1995).

Für die Antwort einer Zelle scheint dabei nicht allein das Hh-Signalmolekül verantwortlich zu sein. Neben der Tatsache, das eine Zelle durch die Expression des Rezeptorkomplexes Ptc und Smo kompetent sein muß, um auf das Signal zu reagieren, scheinen auch andere, bisher nicht im Zusammenhang mit Hedgehog-Signaltransduktion stehende, Faktoren notwendig zu sein, um die Reaktionsfähigkeit einer Zelle zu gewährleisten. So konnte beispielsweise im Zebrafisch gezeigt werden, dass Shh mit dem nodal-ähnlichen Protein Cyclops bei der Spezifizierung von Motorneuronen zusammenwirken muß (Odenthal et al., 2000).

Dorsale Zellschicksale im Neuralrohr werden durch Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie festgelegt, insbesondere der sekretierten Wachstumsfaktoren Bmp4 und 7, Dorsalin und Activin (Basler et al., 1993; Liem et al., 1995, 1997). Die ursprünglich in der Epidermis exprimierten Proteine Bmp4 und 7 induzieren in der dorsal im Neuralrohr gelegenen Dachplatte ein sekundäres Signalzentrum, das eine Kaskade von TGF- $\beta$  Superfamilienproteinen in benachbarten Zellen induziert (Liem et al., 1995; Dickinson et al., 1995; Liem et al., 1997). Nach welchen Mechanismen diese Proteine die Ausprägung unterschiedlicher dorsaler Zellschicksale im Neuralrohr beeinflussen ist nicht abschließend geklärt (Aono et al., 1995; Liem et al., 1997; Jessell und Lumsden, 1997; Barth et al., 1999).

## **1.5. Zielsetzung der Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Verwendung des GAL4-Systems im Zebrafisch getestet und eine Abschätzung der Effizienz der Methode für diesen Organismus vorgenommen werden. Desweiteren sollte durch die gezielte Missexpression bestimmter Gene des Delta/Notch -Signaltransduktionsweges der Kenntnisstand über die Funktion dieses Signalweges insbesondere für Prozesse in neurogenen Regionen des Organismus erweitert werden. Und schließlich sollte durch die Erzeugung einer funktionellen UAS-sonic hedgehog Effektorlinie die Voraussetzung zur genaueren Analyse dieses Gens in einer weiterführenden Arbeit geschaffen werden.

Im Zebrafisch wäre eine Methode zur gezielten Missexpression von Genen von besonderer Bedeutung, da es einerseits relativ viele klonierte Gene gibt, aber andererseits die technischen Voraussetzungen für deren Analyse sehr begrenzt sind. Außerdem wurde durch die großen

Mutagenese-„Screens“ im Zebrafisch bei weitem keine Sättigung erreicht, so dass es für viele Gene keine verfügbaren Mutanten gibt (Driever et al., 1996, Haffter et al., 1996). Ein weiteres Hindernis dürfte hier die Tatsache sein, daß sich viele Gene aufgrund der im Zebrafisch vermuteten Redundanz nicht durch einfache Mutationen aufdecken lassen.

Beispielsweise wurden im Zebrafisch bisher nur zwei Mutationen mit einem neurogenen Phänotyp gefunden. Die Mutation *after eight* (*aei*), die einen leichten neurogenen Phänotyp hervorruft, wurde mittlerweile als eine mutmaßliche Nullmutation des *deltaD* Gens identifiziert (van Eden et al., 1996; Holley et al., 2000). Die molekulare Grundlage der starken neurogenen Mutationen *white tail* und *mindbomb* (van Eden et al., 1996; Schier et al., 1996; Jiang et al., 1996), die zu einer Komplementationsgruppe gehören (Scott Holley, persönliche Mitteilung), ist nach wie vor unbekannt (Scott Holley, persönliche Mitteilung). Die ursprüngliche Vermutung, dass diese Mutationen eines der *notch*-Gene ausschalten würde konnte bisher nicht bestätigt werden und erscheint mittlerweile als unwahrscheinlich (Scott Holley, persönliche Mitteilung).

Die Funktionsanalyse von Komponenten des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges mittels mRNA-Injektion wird durch deren pleiotrope Bedeutung erschwert. Insbesondere die Expression einer konstitutiv-aktiven Form des Transmembranrezeptors Notch führt schon sehr früh zu morphologischen Abnormalitäten (Coffman et al., 1993; diese Arbeit; siehe auch Kapitel 1.1.3.), die eine Analyse später Prozesse kaum ermöglicht. Beispielsweise verhindert eine frühe, ubiquitäre Expression dieses Proteins in *Xenopus* und Zebrafisch die Bildung der Augen (Coffman et al., 1993; diese Arbeit). Die Funktion von aktiviertem Notch bei Zellschicksalsentscheidungen in diesem Organ ist somit durch mRNA-Injektionen nicht zu bestimmen. In *Xenopus*, Hühnchen und Maus wurden diese Probleme durch Lipofektion oder Infektionen mit Retroviren, die das zu untersuchende Gen exprimieren, umgangen (Dorsky et al., 1995, 1997; Henrique et al., 1997; Morrow et al., 1999; Morrison et al., 2000; Furukawa et al., 2000; Gaiano et al., 2000). Der Infektionszeitpunkt kann vom Experimentator frei gewählt werden. Allerdings kann auch auf diese Weise keine komplexe Expression erreicht werden kann. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher mit Hilfe des GAL4-Systems aktiviertes Notch in bestimmten Zellen des Embryos zu exprimieren, um eine Funktionsanalyse auch für späte Entwicklungsprozesse zu ermöglichen. Neben einer Reihe heterologer Promotoren, wurden dafür die aus Zebrafisch stammenden Promotoren des *deltaD*-Gens und des *hsp70*-Gens (Halloran et al., 2000) verwendet.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Verbrauchskemikalien wurden, soweit erhältlich, in der Qualität pro analysis (p.A.), wenn nicht anders genannt, von folgenden Firmen bezogen:

Aldrich (Steinheim); Biometra (Göttingen); Biomol (Hamburg); Biozym (Hameln); Roche Diagnostics GmbH (Mannheim); Fluka (Neu-Ulm); Gibco/BRL (Eggenstein); Merck (Darmstadt); Pharmacia/LKB (Freiburg); Roth (Karlsruhe); Sigma (Deisenhofen)

Zum Ansetzen von Medien und für sämtliche molekularbiologischen Arbeiten wurde Reinstwasser (Milli-Q Wasserreinigungssystem, Millipore Eschborn), im Folgenden einfacherweise mit „H<sub>2</sub>O“ bezeichnet, verwendet.

Lösungen für die Molekularbiologie wurden autoklaviert bzw. sterilisiert (0,2 µm Filter, Schleicher und Schüll). Glaswaren wurden entweder autoklaviert oder hitzesterilisiert.

Enzyme für die Molekularbiologie wurden, soweit nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

Genecraft (Münster); Roche Diagnostics GmbH (Mannheim); Gibco/BRL (Eggenstein)

Das im folgenden aufgelistete Material für Fotoarbeiten wurde von Annacker (Köln) bezogen:

Farbnegativfilm – Ektar 25, Kodak

Farbumkehrfilm – Ektachrom 100, Kodak

Die in dieser Arbeit gezeigten Bildtafeln wurden im Graphikprogramm *Adobe Photoshop* an einem *Macintosh Power PC 8500/120* zusammengestellt und über einen *AGFA PCR II Plus*-Photobelichter oder einen *Epson Stylus (Photo)Drucker* auf *Epson Glossy Paper (Photo Quality)* ausgegeben.



## 2.2 Puffer, Lösungen und Medien

Ampicillin	50 mg / ml in 70 % Ethanol
Auftragungspuffer	0,1 % Bromphenolblau
BCIP-Lösung	50 mg / ml BCIP-Toluidinsalz in DMF
DAB-Stocklösung	1 mg / ml Diaminobenzidin-Hydrochlorid in PBT
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % (w/v) DEPC in H <sub>2</sub> O ü.N. auf 37 °C stellen, dann autoklavieren
DNA-Extraktionspuffer (für gen. DNA)	10 mM Tris, pH 8,2; 10 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,5 % SDS; 200 µg / ml Proteinase K, frisch zugefügt
Embryowasser	40 mg „Instant Ocean“ auf 1 l ddH <sub>2</sub> O
Hyb <sup>-</sup>	50 % Formamid; 5 x SSC; 0,1 % Tween 20
Hyb <sup>+</sup>	976 µl Hyb <sup>-</sup> ; 10 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg / ml); 5 µl Heparin (10 mg / ml); 4 µl Hefe-tRNA (25 mg / ml)
5 x Injektionspuffer	25 mM Tris pH 8,0; 2,5 mM EDTA pH 8,0; 0,5 M KCl
LB-Medium	1 % Bacto Trypton; 0,5 % Bacto Yeast Extrakt; 1 % NaCl; pH 7,4 (+ 2 % Agar für Platten zusetzen)
Mesab	400 mg 3-amino benzoic acidethylester (Sigma); 97,9 ml H <sub>2</sub> O; 2,1 ml 1 M Tris (pH 9); auf pH 7 einstellen Zur Betäubung: 4,2 ml Mesab + 100 ml Tankwasser
Methylenblau-Lösung	0,5 g Borax (Na-tetraborat) in 30 ml H <sub>2</sub> O lösen; 0,5 g Methylenblau zur Lösung geben + auf 50 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen. Steril filtrieren
Methylenblau / Toluidinblau-Lösung	je 5 ml Methylenblau- + Toluidinblau-Lösung mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen
Methylzellulose	3 % in Zebrafischringer
NH <sub>4</sub> Ac / Isopropanol	10 M NH <sub>4</sub> -Acetat mit Isopropanol 1:4 mischen
NBT-Lösung	100 mg / ml NBT-Salz in 70 % DMF
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4% (w/v) PFA in 1 x PBS
PBS	130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,6
PBT	0,3 % Triton-X-100 in PBS (für AK-Färbungen) 0,1 % Triton-X-100 in PBS (für <i>in situ</i> )

Phenolrot	2 % in H <sub>2</sub> O
Proteinase K	14-22 mg / ml (Roche Diagnostic GmbH)
RNase	Stocklösung (10 mg / ml in H <sub>2</sub> O) zur Inaktivierung von DNasen 10 min kochen lassen
RNase-Wasser	50 µg RNase / ml
SDS-Puffer	63 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 % Glycerin; 5 % β-Mercaptoethanol; 3,5 % SDS
SOC-Medium	2 % Bacto Trypton; 0,5 % Bacto Yeast Extrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glukose
20 x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat
STET	8 % Saccharose; 5 % Triton-X-100; 50 mM EDTA, pH 8; 50 mM Tris-HCl, pH 8
TAE	40 mM Tris-Acetat, pH 8; 1 mM EDTA
TE	10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA
Toluidinblau-Lösung	0,2 % in H <sub>2</sub> O
X-Gal Färbelösung	930 µl X-Gal Puffer; 30 µl 100 mM K <sub>4</sub> Fe(CN <sub>6</sub> ); 30 µl 100 mM K <sub>3</sub> Fe(CN <sub>6</sub> ); 10 µl 10 % X-Gal in DMF
X-Gal Puffer	150 mM NaCl; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2
Zebrafischringer (ZFR)	38,7 mM NaCl; 0,97 mM KCl; 1,7 mM Hepes (Sigma); 3,17 mM CaCl <sub>2</sub>

## **2.3 Fischhaltung und Eiablagen**

### **2.3.1 Haltung**

Als Wildtyp-Stamm des Zebrafisches (*Danio rerio*) wurden Tiere verwendet, die ursprünglich aus einem Kölner Aquarienfachgeschäft bezogen und in eigener Zucht vermehrt wurden. Die Haltung erfolgte in einem geschlossenen Aquariensystem (Aquarienbau Schwarz, Göttingen), bei einer Wassertemperatur von ca. 28°C und einem Lichtrhythmus von 14 h hell und 10 h dunkel. Die Aquarienfüllung erfolgte durch ein 1:1-Gemisch von entmineralisiertem (VE) Wasser und Leitungswasser.

Jungfische wurden ohne Fütterung bis zum 5. Tag ihrer Entwicklung in mit Embryowasser oder Zebrafischringer gefüllten Petrischalen in einem 29°C-Brutschrank gehalten. Anschließend wurden die Fische in 2 l Wassercontainern aufgezogen. Bis zu einem Alter von zwei Wochen wurde ein spezielles Trockenfutter (Tetra) für Jungfische verfüttert, danach zunächst Artemien und schließlich Bosmidien und Drosophila-Larven. In Fällen, in denen das Auskreuzen einzelner Fische notwendig war, wurden geschlechtsreife Fische separat in 1 l Plastikboxen gehalten.

### **2.3.2 Eiablage**

Eier wildtypischer Fische wurden in aller Regel aus Kreuzungen mehrerer adulter Tiere erhalten. Dazu wurden 4 Monate bis 2 Jahre alte Zebrafisch-Männchen und -Weibchen bis zu einer Gesamtzahl von maximal 20 Tieren in großen 20 l-Tanks zusammengesetzt. Einmal in der Woche wurde abends eine Laichbox in den jeweiligen Tank gestellt und am nächsten Morgen wurden die Embryonen ca. eine halbe Stunde nach Beginn der Hellzeit abgesammelt. Einzelkreuzungen wurden in 2 l Wassercontainern durchgeführt, deren Böden mit Murmeln bedeckt waren. Die zu kreuzenden Männchen und Weibchen wurden bis zu 6 Stunden vor Beginn der Dunkelzeit zusammengesetzt und die Eier kurz nach dem Beginn der darauffolgenden Hellzeit abgesammelt.

## 2.4 Mikroinjektion

### 2.4.1 Reinigung der zu injizierenden DNA-Fragmente

Zur Herstellung transgener Linien wurden geschnittene und von Vektorsequenzen befreite DNA-Fragmente injiziert. Für die Aufreinigung dieser Sequenzen wurden ca. 50-100 µg Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten und die Fragmente durch Gelelektrophorese in 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Das gewünschte DNA-Stück wurde über einem UV-Tisch mit einem Rasiermesser ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *JETsorb Gel Extraktions-Kits (Gel Extraction Kit / 300)* der Firma Genomed extrahiert. Dabei wurden die Herstellerangaben befolgt. Die Elution der DNA von den Glasmilchkugeln erfolgte mit 50 µl H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *Jet Star 2.0, Plasmid Midi Prep Kit* der Firma Genomed weiter aufgereinigt. Dazu wurde der DNA-Lösung zunächst ein 9-faches Volumen des Äquilibrierungspuffers aus dem Aufreinigungs-Kit hinzugefügt. Danach wurde die Lösung über eine äquilibrierte Säule gegeben und alle weiteren vom Hersteller empfohlenen Schritte für die Aufreinigung von Plasmid-DNA befolgt. Die gefällte DNA wurde schließlich in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.4.2 Injektionslösung

Die Injektionslösung enthielt die folgenden Komponenten: 35-50 ng / µl des zu injizierenden DNA-Fragmentes; 0,2 % Phenolrot zur Abschätzung des Injektionsvolumens; 1 x Injektionspuffer zur Erzeugung physiologischer Bedingungen; H<sub>2</sub>O zur Verdünnung.

### 2.4.3 Injektionen

Die DNA-Lösung wurde vornehmlich in die sich bildende Plasmakappe des frühen Zygotenstadiums injiziert. Die Mikroinjektionen erfolgten unter einem *Zeiss*-Stereomikroskop (*Stemi DRC*). Der für die Injektionen notwendige Druck wurde mit gasförmigem Stickstoff erzeugt und durch ein WPI-Injektionsgerät (*PV 820*) reguliert. Die Bewegungen der Kapillare wurden mit Hilfe eines Leitz-Mikromanipulators ausgeführt.

Als Mikropipetten wurden 1 mm Hilgenberg-Glaskapillaren mit Innenfilament verwendet, die auf einem *Flaming / Brown P-97 Micropipette Puller* der Firma Sutter Instruments Co ausgezogen und unmittelbar vor der Injektion unter dem Stereomikroskop mit einer feinen Uhrmacherpinzette auf eine geeignete Länge gekürzt wurden. Als Geräteeinstellung wurden folgende Parameter zur Herstellung geeigneter Injektionsnadeln empirisch ermittelt: *heat-537; pull-100; velocity-100; time-150*.

Die Injektionen erfolgten in Zebrafischringer. Dabei wurde das Ei mit der Kapillarenspitze in eine für die Injektion günstige Orientierung gebracht und die Kapillare in steilem Winkel durch das Chorion hindurch in das Cytoplasma eingeführt. Daraufhin wurde durch Betätigung eines Fußschalters für eine Sekunde der Injektionsdruck aufgebaut und die DNA-Lösung ins Ei injiziert. Erfolgreiche Injektionen waren durch eine leichte Rotfärbung des Cytoplasmas zu erkennen. Aus der Zahl der Embryonen, die mit einem gegebenen Volumen Lösung injiziert werden konnten ergab sich, daß pro Embryo ungefähr 5-10 nl Injektionslösung injiziert wurden.

Am Tag nach der Injektion mit einem bestimmten DNA-Fragment wurde überprüft, wieviele der befruchteten, injizierten Eier sich normal entwickelt hatten. Gegebenenfalls wurde daraufhin die DNA-Konzentration neu eingestellt, so daß gewährleistet war, daß bei folgenden Injektionen etwa 70 % der Embryonen keine erkennbaren morphologischen Defekte zeigten.

#### **2.4.4 Kumulative BrdU-Injektionen**

In einigen Fällen sollte die Teilungsfähigkeit von Zellen über einen längeren Entwicklungszeitraum bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde das Basenanalogue BrdU in Embryonen injiziert, welches in die DNA sich teilender Zellen eingebaut wird und mit einer Antikörperfärbung nachweisbar ist. Um auszuschließen, daß das verfügbare BrdU limitierend bei der Markierung sich teilender Zellen ist, wurden kumulative, d.h. sich in einigen Abständen wiederholende, Injektionen durchgeführt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Embryonen des gewünschten Stadiums dechlorinisieren, in einen Tropfen Methylzellulose geben, gegebenenfalls mit MESAB anästhesieren und damit einorientieren

- Kapillare mit BrdU-Lösung (30 mM in 40 % EtOH) füllen und Lösung in den Dotter bzw. bei älteren Stadien in den zum Herzen führenden Blutstrom unmittelbar vor dem Herzsack injizieren
- mit Zebrafischringer überschichten und bis zur nächsten Injektion bei 29°C inkubieren

## **2.5 Sichtung potentiell transgener Gründerfische und Isolierung transgener Fischlinien**

Sowohl der Nachweis der injizierten DNA-Fragmente in der Keimbahn der manipulierten Fische ( $F_0$ ) und somit eine mögliche Integration ins Genom, wie auch die endgültige Isolierung transgener Linien wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Methode zur gezielten Amplifikation geringer Mengen spezifischer DNA-Fragmente um einen Faktor von  $10^5$ - $10^9$  (Mullis, 1990). Das gesamte Protokoll zur Herstellung, Identifizierung und Etablierung transgener Fischlinien ist in Abb. 2.1 dargestellt. Injizierte, potentielle Gründerfische wurden untereinander oder gegen Wildtyppartner ausgekreuzt und Gruppen von 24 h alten  $F_1$ -Embryonen durch PCR auf das Vorhandensein des injizierten DNA-Fragmentes getestet. Da durch Mikroinjektion erzeugte Gründerfische aufgrund eines späten Insertionsereignisses einen starken Keimbahnmosaizismus aufweisen können (Stuart et al., 1988) wurden mindestens 100  $F_1$ -Nachkommen jedes injizierten Fisches getestet. Konnten PCR-Signale reproduzierbar nachgewiesen werden, so wurde der entsprechende Gründerfisch erneut gegen einen Wildtyppartner gekreuzt und mindestens 100  $F_1$ -Nachkommen wurden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen. Nach Gewinnung genomischer DNA aus den Schwanzflossen der einzelnen Adulttiere wurden mittels PCR transgene Individuen jeder Linie identifiziert. Der Nachweis des Transgens in der Schwanzflosse wurde auch in den folgenden Generationen für jedes Einzeltier in der beschriebenen Weise erneut durchgeführt. In aller Regel wurde ein Transgen nicht über mehrere Generationen in Homozygose gehalten, sondern Träger der Insertion wurden immer wieder gegen Wildtyppartner gekreuzt, da sich Inzuchtlinien als weniger robust im Vergleich zu heterogenen Fischen erwiesen haben (Cyrus Papan und Christoph König, persönliche Mitteilung; eigene Beobachtung).

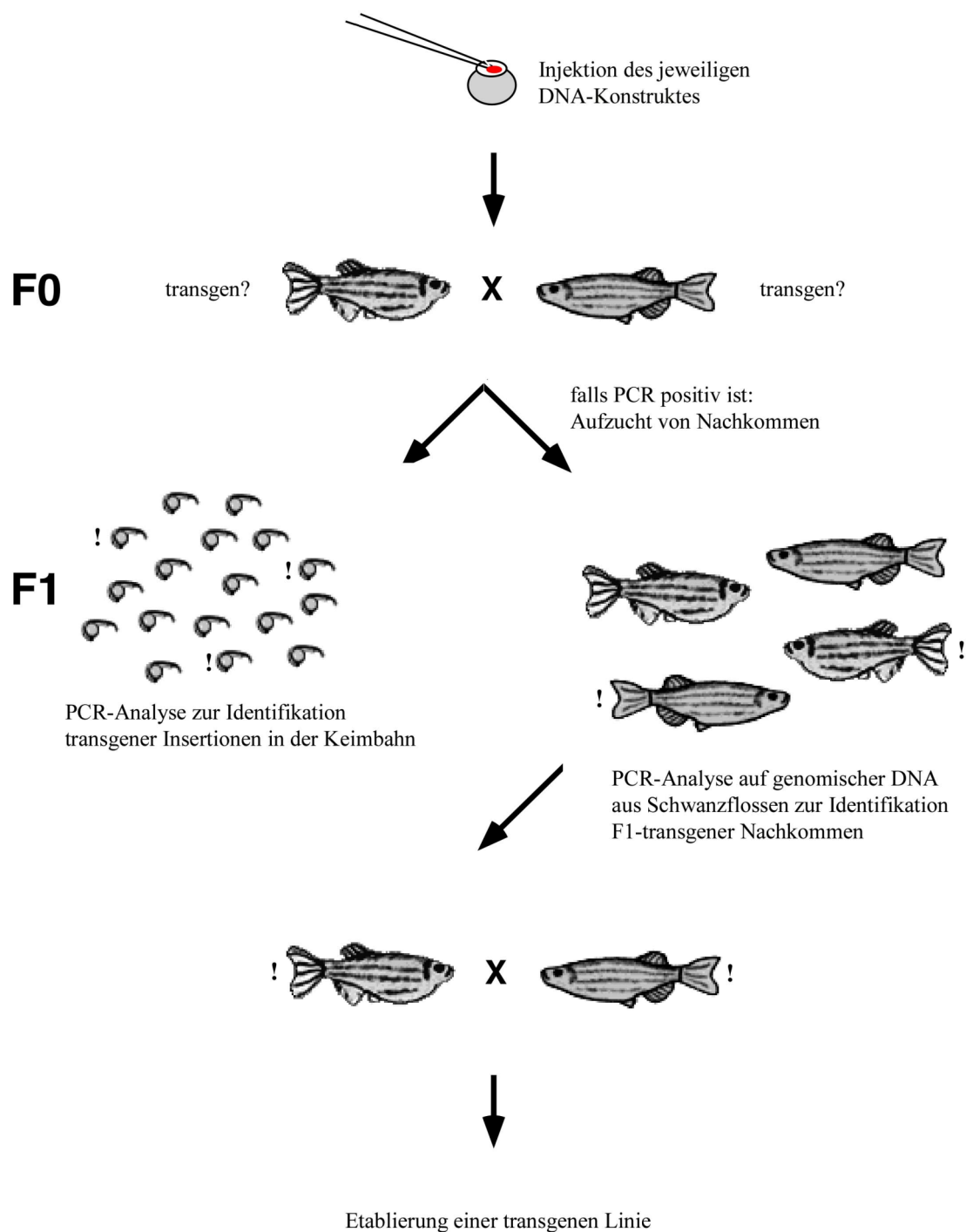


Abb. 2.1: Schema der, in der vorliegenden Arbeit gewählten, Methode zur Herstellung, Identifizierung und Etablierung transgener Linien beim Zebrafisch. Injizierte, potentielle Gründerfische (F<sub>0</sub>) wurden durch PCR-Analysen auf genomischer DNA von deren Nachkommen auf das Vorhandensein des Transgens in der Keimbahn getestet. Transgene F<sub>1</sub>-Nachkommen PCR-positiver Gründerfische wurden durch PCR-Analysen auf genomischer DNA aus Schwanzflossen identifiziert. Diese wurden zur Etablierung von transgenen Linien mit transgenen Geschwisterfischen oder Wildtypen gekreuzt. Transgene Insertionen sind durch ein Ausrufezeichen markiert.

### 2.5.1 Extraktion genomischer DNA aus F<sub>1</sub>-Embryonen und Schwanzflossen

F<sub>1</sub>-Embryonen wurden für einen Tag in Embryowasser oder Zebrafischringer bei 29°C gehalten. Adulte Fische wurden für die Schwanzflossen-Amputation mit Mesab betäubt und die Schwanzflosse mit einer feinen Schere abgeschnitten. Die Fische wurden danach bis zur Auswertung des Ergebnisses in Einzelboxen gehalten. Nach einer Woche hatte sich die Schwanzflosse in aller Regel regeneriert und die Fische konnten gekreuzt werden.

Die Extraktionen wurden nach einem Protokoll aus dem *Zebrafischnachbuch* (nach A.Fritz, S.9.8.) durchgeführt:

- Überführen von bis zu 30 Embryonen bzw. einer abgeschnittenen Schwanzflosse in ein Eppendorf-Zentrifugenröhrchen und Absaugen der Flüssigkeit
- Waschen mit H<sub>2</sub>O
- Absaugen der Flüssigkeit
- Zugabe von 50 µl DNA-Extraktionspuffer / Proteinase K zur Schwanzflosse oder zu den Embryonen oder bei mehr als fünf Embryonen 10 µl pro Embryo
- Inkubation bei 50°C für mindestens 3 h unter gelegentlichem Vortexen
- Zugabe eines doppelten Volumens EtOH, mischen und 30' auf Eis stellen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet mit 70 % EtOH waschen und für 2' zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet trocknen
- Pellet aus Schwanzflossen-Präparation in 4 µl TE lösen, Pellet genomischer DNA aus Embryonen in 20 µl TE oder in 4 µl pro Embryo bei mehr als fünf Embryonen lösen
- Lagerung bei -20°C

Für die 25 µl PCR-Reaktionen wurden 5 µl genomischer DNA-Lösung eingesetzt.



## 2.5.2 Primer

Für die PCR-Analysen wurden Primer verwendet, die mit dem Programm *PRIMERS* für den *Apple Macintosh PC* nach folgenden Kriterien ausgewählt wurden:

- Der vom jeweiligen Primerpaar amplifizierte Bereich sollte nicht mehr als 1 kb betragen, um eine schnelle und effiziente Amplifikation zu ermöglichen
- Die Anlagerungstemperatur  $T_A$  („annealing“) sollte bei über  $55^\circ\text{C}$  liegen, damit eine hohe Spezifität gewährleistet ist
- Störende Interaktionen der Primer mit sich selbst (Haarnadelschleifen, Dimerisierung) und mit dem anderen Primer sollten möglichst ausgeschlossen werden
- Unspezifische Bindungen in der Zielsequenz sollten minimiert werden.

Folgende Primer wurden ausgewählt und von der Firma Eurogentec synthetisiert:

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	$T_A$ ( $^\circ\text{C}$ )	Lage des Primers
TK1	CAGCGTCTTGTCATTGGCGAAT	22	67,1	TK-Element (di)
CARDI	CCTGGCGTGATGAATGTGC	19	64,2	Carp $\beta$ -act. Prom. (di)
EF1A	GGCTGAATGTTCTGTCAAGACCC	23	64,8	<i>Xefl</i> _ Promotor (di)
HSPDI	CGGGCATTACTTTATGTTGC	21	59,9	<i>Zfhsp70</i> Promotor (di)
DLD1	CAACAGAGCATCAACCCGAGC	21	65,8	<i>ZfdeltaD</i> Promotor (di)
TKRE2	CATCATTAGCGTCGGTGAGTGC	22	65,5	<i>gal4</i> (re)
CARRE	GCCCTAGTCAGCGGAGACC	19	62,8	<i>gal4</i> (re)
ZFARE	CATCATTAGCGTCGGTGAG	19	58,3	<i>gal4</i> (re)
ZFARE2	GCCTTGATTCCACTTCTGG	19	58,7	<i>gal4</i> (re)
E1B2	CATCGCGTCTCAGCCTCAC	19	63,7	UAS (di)
SHHDI	CTCGTTCGCACCAAGTGAC	18	59,4	<i>Zfshh</i> (di)
MNREV	CGGAATCGTTTATTGGTGTCG	21	62,9	<i>Zfnotch1b:intra</i> (re)
H4RE2	CAAGAAATCAAGCGTCATCTCC	22	61,6	<i>Zfher4</i> (re)
SHHRE	CTGCTCCCATTCTACAGTTCC	21	59,3	SV40 <i>polyA</i> (re)
LACRE	CGAGTGGCAACATGGAAATC	20	61,9	<i>lacZ</i> (re)
GFP1	CGTGTCTTGTAGTTCCCCTCATC	23	63,5	<i>gfp</i> (re)

di = direkte Orientierung; re = reverse Orientierung des Primers

Für die spezifische Erkennung der injizierten Konstrukte wurden folgende Primerkombinationen ausgewählt:

Erkanntes Konstrukt	Primerkombination	T <sub>A</sub> (°C)	Länge des amplif. Bereiches (bp)
<i>cmvtk/svtk – gal4</i>	TK1 / TKRE2	62	950
Carp <i>β-actin – gal4</i>	CARDI / CARRE	62	500
<i>X efla – gal4</i>	EF1A / TKRE2	62	950
<i>Zf hsp70 – gal4</i>	HSPDI / ZFARE	57	950
<i>Zf hsp70 – galad1</i>	HSPDI / ZFARE2	57	450
<i>ZF deltaD – gal4</i>	DLD1 / TKRE2	62	950
UAS – <i>notch1b:intra</i>	E1B2 / MNREV	62	450
UAS – <i>her4</i>	E1B2 / H4RE2	58	300
UAS - <i>shh</i>	SHHDI / SHHRE	59	500
UAS - <i>lacZ</i>	E1B2 / LACRE	62	800
UAS - <i>gfp</i>	E1B2 / GFP1	62	400

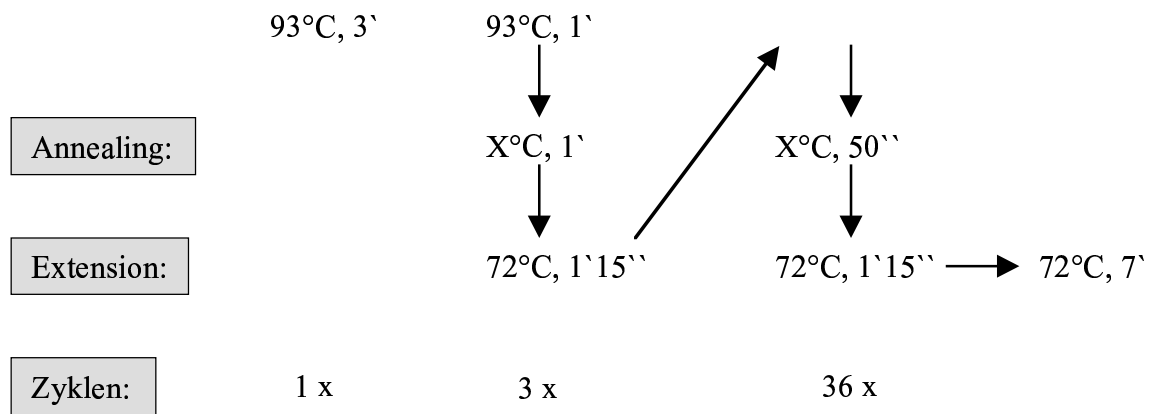
### 2.5.3 PCR-Analysen

Die PCR-Analysen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit der *BioTherm*<sup>TM</sup>-Polymerase und dem mitgelieferten optimierten Puffer der Firma Genecraft durchgeführt. Folgende Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten wurden gewählt:

- 0,4 µM je Primer
- 1 x optimierter Puffer / 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 5 µl extrahierte genomische DNA
- 0,28 mM dNTPs
- 1 U Taq-Polymerase
- H<sub>2</sub>O add 25 µl

Die Reaktionen wurden in einem *TRIO-Thermoblock*<sup>TM</sup> der Firma Biometra durchgeführt. Die Denaturierungstemperatur betrug 93°C, die Extensionstemperatur 72°C und die „Annealing“-Temperatur war für das jeweilige „Primer“-Paar spezifisch. Der Zeitablauf der Reaktionen wurden folgendermaßen gewählt:

Denaturierung: Denaturierung:  $\longrightarrow$  93°C, 50''



Um eine möglichst hohe Sensitivität zu gewährleisten und unspezifische Reaktionen vor dem Erreichen des ersten Denaturierungsschrittes zu vermeiden, wurden die Reaktionen nach einem sogenannten „hot start“-Protokoll durchgeführt (Innis et al., 1990). Dabei wurden die einzelnen Komponenten den Ansätzen zu zwei unterschiedlichen Zeiten zugefügt. Bereits vor Beginn der anfänglichen Denaturierungsperiode waren in einem Volumen von 20 µl die thermostabilen Komponenten (Primer, genomische DNA und Reaktionspuffer mit MgCl<sub>2</sub>) enthalten („hot mix“). Der Ansatz wurde mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet, um Evaporation während der Reaktion zu vermeiden. Die dNTPs und die Polymerase wurden in einem Volumen von 5 µl erst nach Erreichen der Denaturierungstemperatur hinzugefügt („taq mix“).

Die Analyse der PCR-Reaktionen erfolgte durch Auftragen von 10-15 µl der Ansätze auf 1 %ige Agarosegele.

## 2.6 Hitzeschock von Zebrafisch-Embryonen

Um eine induzierbare Expression bestimmter Gene zu ermöglichen, wurden Hitzeschock-Experimente an Zebrafisch-Embryonen durchgeführt, die eine transgene Insertion von *gal4* unter Kontrolle des *hsp70*-Promotors tragen. Zu diesem Zweck wurden bis zu 15 Embryonen in Zebrafisch-Ringer in ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß (Firma Biozym) überführt. Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin in eine PCR-Maschine (*TrioThermoblock<sup>TM</sup>*, Firma Biometra) gestellt und für eine dem jeweiligen Zweck angepasste Zeit mit einer bestimmten Temperatur erhitzt. Falls nicht anders vermerkt lagen diese Werte typischerweise bei 40°C für 30 min.

## 2.7 Histologische Methoden

## 2.7.1 Antikörperfärbungen

Als Basisprotokoll für Antikörperfärbungen diente eine Vorschrift von R. BreMiller aus dem *Zebrafischnachbuch* (S. 8.6), das je nach Bedarf und Alter der Organismen abgeändert und ergänzt wurde (siehe unten):

- Embryonen oder Larven wurden in 4% PFA ü.N. bei 4°C fixiert, 2 x kurz mit PBT gewaschen, mit feinen Uhrmacherpinzetten dechorionisiert und danach entweder direkt weiter verwendet oder bei 20°C in 100 % MeOH oder EtOH gelagert.
- 2 x 5' mit PBT waschen und kurz mit H<sub>2</sub>O spülen
- Embryonen bis zu einem Alter von 48 h in eiskaltem Aceton für 7' bei -20°C inkubieren
- kurz in H<sub>2</sub>O spülen und 2 x 5' mit PBT waschen
- 2 h bei RT in 10 % Ziegen Serum / PBT präinkubieren
- bei 4°C ü.N. mit dem jeweiligen 1. Antikörper in 10 % Ziegen Serum / PBT inkubieren
- 3 x 20' mit PBT waschen
- bei 4°C ü.N. mit dem jeweiligen 2. Meerrettich-Peroxidase gekoppelten oder Fluoreszenzmarkierten Antikörper in 10 % Ziegen Serum / PBT inkubieren
- 3 x 20' mit PBT waschen
- Embryonen in Dreierblockschälchen überführen
- 400 µl PBT und 100 µl 10 %ige DAB-Lösung hinzugeben und mindestens für 15' bei RT im Dunkeln inkubieren
- Färbereaktion durch Zugabe von 1,5 µl einer 30 %igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung starten und unter dem Stereomikroskop kontrollieren
- bei ausreichender Färbung Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBT stoppen
- je nach Bedarf in Araldit oder Glycerin einbetten

Folgende Modifikationen dieses Protokolls wurden eingeführt:

Embryonen oder Larven, die älter als 48 h waren, wurden vor dem Acetonschritt ohne Schütteln jeweils für 5-30' mit 10 µg / µl Proteinase K / PBT und für 30' mit 0,1 % Kollagenase / PBT inkubiert. Nach jedem dieser Schritte wurden die Objekte 2 x 5' mit PBT gewaschen, für 20' bei RT mit 4 % PFA nachfixiert und erneut gewaschen. Zusätzlich wurden die Objekte nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper im Dunkeln ü.N. bei RT auf einem Schüttler mit 1 %iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung / PBT gebleicht.

In denjenigen Fällen, wo der Färbung der Retina eine besondere Bedeutung zukam, wurden bei Embryonen oder Larven, die älter als 48 h waren, nach der 1. Fixierung die Linsen mit sehr spitzen Nadeln entfernt. In diesen Fällen wurde in aller Regel auf eine Proteinase K-Behandlung verzichtet, da sonst das Gewebe zu sehr in Mitleidenschaft gezogen wurde.

In einigen Fällen wurde den Inkubationsschritten mit den Antikörpern DMSO in einer Endkonzentration von 1-10 % zugesetzt, um eine bessere Penetranz des Gewebes zu erreichen.

Weiterhin wurde in Fällen, in denen die Sensitivität ein Problem darstellte und grundsätzlich bei Embryonen oder Larven, die älter als 48 h waren, ein Verstärkersystem (*EliteABC kit*) der Firma VECTASTAIN verwendet, das sich die besonderen Bindungseigenschaften von Biotin und Streptavidin zu eigen macht. In diesen Fällen wurde als zweiter Antikörper ein an Zebrafisch-Embryonen präabsorbierter, biotinylierter Universalantikörper aus dem Verstärkersystem in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Die Inkubationsschritte erfolgten in 1-5 %igem Pferdeserum anstelle des Ziegenserums und nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurden die Objekte 10 x 10 Minuten mit PBT gewaschen, um das Serum vollständig zu entfernen. Nach dem Bleichen wurden die Embryonen oder Larven bei 4°C ü.N. in einem Gemisch aus 960 µl PBT und jeweils 20 µl der Lösungen A und B aus dem Verstärkersystem inkubiert und danach erneut mindestens 6 x 10 Minuten mit PBT gewaschen. Schließlich erfolgte die bereits oben beschriebene Färbereaktion.

In denjenigen Fällen, bei denen mit einem Fluoreszenz-markierten 2. Antikörper gearbeitet wurde, schlossen sich an die Inkubation mit dem 2. Antikörper 10 zehnmütige Waschrinne mit PBT an und danach wurden die Objekte für die Auswertung am konfokalen Mikroskop vorbereitet.

Zusammengefaßt mussten die Bedingungen und Antikörperverdünnungen für jede Anwendung und jeden Antikörper individuell bestimmt werden.

**Folgende Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:**

Name und Art des verwendeten Antikörpers ( <b>Kurzbezeichnung</b> )	Erhalten von bzw. Referenz	Ver- dünnung
polyklonaler Schaf $\alpha$ -Digoxigenin, alkalische Phosphatase konjugiert ( <b>sheep <math>\alpha</math>-DIG-AP</b> )	Boehringer-Mannheim	1:6000
polyklonales Ziege F(ab') <sub>2</sub> -Fragment gegen Maus IgM und IgG (H+L), Meerrettich-Peroxidase konjugiert ( <b>goat <math>\alpha</math>-mouse-HRP</b> )	Dianova, Hamburg	1:1000
monoklonaler Maus $\alpha$ -myc ( <b><math>\alpha</math>-myc</b> )	A. Klaes	1:2
polyklonaler Kaninchen $\alpha$ -menschliches phospho-Histon H3 ( <b><math>\alpha</math>-H3</b> )	upstate biotechnology, Lake Placid	1:100
monoklonaler Maus $\alpha$ -acetyliertes Tubulin aus Seeigel ( <b><math>\alpha</math>-acet.Tub</b> )	Sigma, Deisenhofen	1:100
monoklonaler Maus $\alpha$ -menschliches neuronales Protein HuC/HuD ( <b><math>\alpha</math>-Hu oder 16A11</b> )	Molecular Probes, Eugene	1:50
monoklonaler Maus Antikörper gegen ein nicht identifiziertes Antigen aus Zebrafisch-Stäbchen ( <b>FRet11</b> )	Monoclonal Antibody Facility, Oregon Schmitt und Dowling, 1996	1:50
monoklonaler Maus Antikörper gegen ein nicht identifiziertes Antigen aus Zebrafisch-Doppelzapfen ( <b>FRet43</b> )	Monoclonal Antibody Facility, Oregon Larison und BreMiller, 1990	1:50
monoklonaler Maus Antikörper gegen ein nicht identifiziertes Antigen aus radialen Gliazellen aus Zebrafisch ( <b>zrf1</b> )	Monoclonal Antibody Facility, Oregon Trevarrow et al., 1990	1:50
monoklonaler Maus $\alpha$ -BrdU ( <b><math>\alpha</math>-BrdU</b> )	Sigma, Deisenhofen	1:50
monoklonaler Maus Antikörper gegen ein nicht identifiziertes Antigen aus bestimmten Neuronen des Zebrafisches ( <b>zn12</b> )	Monoclonal Antibody Facility, Oregon Trevarrow et al., 1990	1:50
monoklonaler Maus Antikörper gegen ein nicht identifiziertes Antigen aus bestimmten Neuronen des Zebrafisches ( <b>zn8</b> )	Monoclonal Antibody Facility, Oregon Trevarrow et al., 1990	1:50
polyklonaler Kaninchen $\alpha$ -Maus Antikörper, Cy-5-konjugiert ( <b>Cy5</b> )	Dianova, Hamburg	1:50

**2.7.2 WHOLE MOUNT – *in situ* Färbungen an Embryonen**

Geeignete Sonden für die *in situ* Hybridisierung am Zebrafisch wurden durch *in vitro*-Transkription unter Verwendung des Boehringer Kits „Dig RNA Labeling and Detection kit

*nonradioactive*“ mit Digoxigenin (bzw. in manchen Fällen Fluorescein)-markiertem UTP hergestellt, wobei im Wesentlichen die Angaben des Herstellers befolgt wurden.

### **Herstellung Digoxigenin / Fluorescein-markierter RNA-Sonden**

Folgendes Protokoll wurde verwendet:

- zur Herstellung von Gegenstrang („antisense“)-Sonden den Vektor im 5'-Bereich des als Matrize dienenden cDNA-Fragmentes mit einem geeigneten Enzym linearisieren
- den linearisierten Vektor mit Phenol und Chloroform extrahieren, mit EtOH fällen und in einem geeigneten Volumen DEPC-H<sub>2</sub>O aufnehmen
- die Markierung erfolgt für 2 h bei 37°C in folgendem Reaktionsansatz:

x µl linearisierter Vektor (x µl sollen 1 µg Vektor enthalten)

2 µl 10 x Transkriptionspuffer

2 µl Dig / Flu-NTP labeling mix

1 µl RNase-Inhibitor (40 U / µl)

2 µl T3 oder T7-Polymerase

auf 20 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen

- nach Ablauf der Inkubationszeit 1 U RNase-freie DNase (Roche) zugeben, um die noch vorhandene Vektor-DNA abzubauen, und den Reaktionsansatz für weitere 30' bei 37°C inkubieren
- die Reaktion mit 2 µl 0,1 M EDTA abstoppen und die Sonde zur Aufreinigung auf eine mit RNase freiem Sephadex (G-50, Fluka; in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert) beladene Säule (*QIAquick<sup>TM</sup> PCR Purification Kit (50)* der Firma QIAGEN) geben (Vorbereitung der Säule: ca. 600 µl Sephadex-Lösung auf die Säule geben; 1' bei 4.000 rpm zentrifugieren; Eluat verwerfen)
- die Säule in ein Eppendorf-Zentrifugenröhrchen stellen und 1' bei 4000 rpm zentrifugieren
- dem Eluat zur Fällung 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl 100 % EtOH zugeben und für mindestens 2 h bei -20°C stehen lassen
- 30' bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, mit 70 % EtOH waschen, kurz zentrifugieren und Pellet trocknen
- Aufnehmen in 80 µl DEPC-H<sub>2</sub>O / 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U / µl)

Folgende Sonden wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Sonde	Name des Vektors	Vektor erhalten von	linearisieren mit	Polymerase
<i>gal4</i> (ganz)	pBsHIII-galHIII	selbst hergestellt	Asp718	T3
<i>gal4</i> (5')	pBsGALHIII/ClaI	selbst hergestellt	HindIII	T3
<i>her4</i>	pBs her4	E. von Weizäcker	XhoI	T3
<i>islet-1</i>	pBs isl-1	V. Korzh	EcoRI	T7
<i>ngn</i>	pBL: Z ngn1	U. Strähle	XhoI	T7
<i>dID</i>	pBs dID	P. Dornseifer	HindIII	T3
<i>elav/HuC</i>	HuC	O. Muraoka	SacI	T7
<i>pax2</i>	pax2	M. Brand	BamHI	T7
<i>shh</i>	pHH	P. Ingham	HindIII	T7
<i>ptc1</i>	pBsKS ptc1	K. Lewis	BamHI	T3
<i>myoD</i>	pBs myoD	E. Weinberg	BamHI	T7
<i>gfp</i>	pBs gfp insi	selbst hergestellt	XbaI	T3
<i>lacZ</i>	pBs lacZ	C. König	PstI	T3

### Digoxigenin-Färbung

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Embryonen in 4 % PFA ü.N. bei 4°C oder 2 h bei RT fixieren
- 2 x kurz in PBT waschen und dechorionisieren
- Embryonen 3 x kurz mit kaltem 100 %igen MeOH waschen und dann entweder längerfristig bei 20°C in MeOH lagern oder für die weitere Verwendung mindestens unter den gleichen Bedingungen inkubieren
- für 5' mit 50 % MeOH / PBT waschen
- für 5' mit 30 % MeOH / PBT waschen
- 2 x 5' in PBT waschen
- für 20' in 4 % PFA nachfixieren
- 2 x 5' in PBT waschen
- zur stärkeren Permeabilisierung der Embryonen ohne Taumeln mit 2 µg / ml Proteinase K / PBT inkubieren (bis 12 Somiten-Stadium für 3'; bis 24 Somiten-Stadium für 5'; ältere Stadien für 8')
- kurz mit PBT spülen, dann 5' mit PBT waschen
- für 20' in 4 % PFA nachfixieren



- 5' mit PBT waschen
- zur Unterdrückung endogener Phosphatasen Embryonen in 1 ml 0,1 M Triethanolamin pH 7 mit 2,5 µl Acetanhydrid für 10' inkubieren
- 2 x 5' in PBT waschen
- Embryonen für 5' in Hyb<sup>-</sup> bei 65°C inkubieren, dann 4 h bei 65°C in Hyb<sup>+</sup> prähybridisieren
- 100 µl frisches Hyb<sup>+</sup> mit 1 µl denaturierter, digoxigenin-markierter RNA-Probe zugeben und für 16 h bei 65°C inkubieren
- Hybridisierungslösung entfernen (kann wiederverwendet werden)
- 10' bei 65°C mit 75 % Hyb<sup>+</sup> / 25 % 2 x SSC waschen
- 10' bei 65°C mit 50 % Hyb<sup>+</sup> / 50 % 2 x SSC waschen
- 10' bei 65°C mit 25 % Hyb<sup>+</sup> / 75 % 2 x SSC waschen
- 10' bei 65°C mit 2 x SSC waschen
- 2 x 30' bei 65°C mit 0,2 x SSC waschen
- 10' mit 75 % 0,2 x SSC / 25 % PBT waschen
- 10' mit 50 % 0,2 x SSC / 50 % PBT waschen
- 10' mit 25 % 0,2 x SSC / 75 % PBT waschen
- 10' mit PBT waschen
- 2 h in 1 % BSA / PBT präinkubieren
- Inkubation bei 4°C ü.N. mit alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Dig Fab-Fragmenten (zuvor auf unbehandelten Embryonen präabsorbiert), 1:6000 verdünnt in 1 % BSA / PBT
- 8 x 15' mit PBT waschen
- Embryonen 2 x 5' in Dig-Färbelösung waschen
- 1 ml frische Dig-Färbelösung mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP zugeben und in Dreierblockschälchen überführen
- Im Dunklen inkubieren und bei ausreichender Färbung Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBT abstoppen
- je nach Bedarf in Araldit oder Glycerin einbetten

### **Digoxigenin / Fluorescein-Doppelfärbung**

In manchen Fällen wurde eine Dig (blau) / Flu (rot)-Doppelfärbung an Embryonen durchgeführt, um die Expression zweier unterschiedlicher RNA-Typen in einem Embryo beobachten zu können. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Protokoll von oben verfolgen, nur die Embryonen jetzt mit beiden markierten Sonden ü.N. bei 65°C inkubieren und bei der Inkubation mit den Fab-Fragmenten den anti-Flu Antikörper (1:1000) verwenden
- nach den 8 x 15'-Waschschritten in PBT die Embryonen 2 x 5' in 0,1 M Tris pH 8,2 / 0,1 % Tween 20 waschen
- während des Waschens eine Fast-Red-Tablette (Boehringer Mannheim) in 2 ml 0,1 M Tris pH 8,2 / 0,1 % Tween 20 auflösen
- Embryonen zusammen mit der Färbelösung in Dreierblockschälchen überführen und wie bei der Dig-Reaktion färben lassen
- bei ausreichender Färbung 3 x 5' mit PBT waschen
- freie Phosphataseaktivität durch Inkubation für 0' in 0,1 Glycin-HCl pH 2,2 / 0,1 % Tween 20 blockieren
- 4 x 5' mit PBT waschen
- Inkubation bei 4°C ü.N. mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem anti-DigFab-Fragmenten, wie oben beschrieben und danach das Protokoll für die Dig-Färbung zu E führen

### 2.7.3 Kombinierte *in situ* Hybridisierung und Antikörperfärbung

In manchen Fällen wurde eine *in situ* Hybridisierung und eine myc-Antikörperfärbung an denselben Embryonen durchgeführt, um gleichzeitig das Expressionsmuster eines bestimmten RNA-Typs beobachten und das Vorhandensein von myc-Epitopen nachweisen zu können. In diesen Fällen wurden die Embryonen mit EtOH, anstelle von MeOH behandelt, da sich herausgestellt hatte, daß das myc-Epitop nach Behandlung mit MeOH nicht von diesem Antikörper erkannt wird. Die *in situ* Hybridisierung wurde wie beschrieben durchgeführt, wobei der anti-myc Antikörper zusammen mit den alkalischen Phosphatase-gekoppelten Dig Fab-Fragmenten inkubiert wurde. Danach wurde die *in situ* Hybridisierung beendet und anschließend der zweite Antikörper der Immunofärbung bei 4°C inkubiert. Die Antikörperfärbung wurde danach in der beschriebenen Weise beendet.

### 2.7.4 Kombinierte BrdU-Antikörperfärbung und DNA-Färbung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch BrdU-Antikörperfärbungen mit DNA-Färbungen kombiniert, um das Verhältnis von BrdU-markierten Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der

Zellen zu bestimmen. Für die DNA-Färbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff YOYO-1 (Molecular Probes) verwendet. Folgendermaßen wurde vorgegangen:

- Embryonen wie beschrieben in 4 % PFA fixieren
- 3 x 10' mit PBT waschen
- Embryonen zur Entfernung von Ribonukleinsäuren 1 h bei RT mit 2 N HCl behandeln
- ü.N. bei RT in einer 1:2500-Verdünnung in YOYO-1 / PBT inkubieren
- 3 x 20' in PBT waschen

Danach wurde die unter 2.9.1 beschriebene Antikörperfärbung angeschlossen, wobei auf das Bleichen der Objekte verzichtet wurde, um eine Abschwächung der Fluoreszenzfärbung zu verhindern. Die Objekte wurden in Durcupan eingebettet, geschnitten und die Schnitte am konfokalen Mikroskop (*LSM 410 invert*, Zeiss) ausgewertet.

### **2.7.5 X-Gal Färbungen zum Nachweis von LacZ-Aktivität**

Der Test auf LacZ-Aktivität in Zebrafischembryonen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Fixieren der Embryonen für 10' bei RT in 12,5 % Glutaraldehyd / PBS
- kurz mit H<sub>2</sub>O waschen, dann 3 x mit PBS / 3 % Triton X-100
- Embryonen mit Uhrmacherpinzetten dechorionisieren
- für mehrere Stunden oder ü.N. in X-Gal Färbelösung bei 37°C inkubieren
- Reaktion durch mehrmaliges Waschen in PBT stoppen

### **2.7.6 Neuromastenfärbung an lebenden Zebrafischlarven**

Um die Neuromasten lebender Zebrafischlarven sichtbar zu machen, wurden diese mit 2-(4-Dimethylaminostyryl)-1-Methylpyridiniumiodid (Fluka) gefärbt. Dieser fluoreszierende Farbstoff ist nicht toxisch, photostabil und er färbt spezifisch mechanosensorische Axone. Zur Färbung werden einige Kristalle des Farbstoffes in Zebrafischringer aufgelöst, so dass sich die Lösung hellorange färbt und die Larven werden für ca. 10 Minuten in die Lösung gegeben. Anschließend werden sie einige Male in Ringer gewaschen und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

## **2.8 Einbettung von Embryonen und Larven**

Je nach Anwendung wurden die Objekte entweder in Glycerin oder Durcupan eingebettet.

### **2.8.1 Einbettung in Glycerin**

Embryonen oder Larven bei RT solange in 30 %, 50 %, 70 % und 87 % Glycerin aufbewahren bis sie absinken.

Embryonen jünger als 20 h wurden in aller Regel mit spitzen Nadeln vom Dottersack befreit und freie Dotterschollen mit einem feinen Haar beseitigt. Danach wurden sie mit der ventralen Seite zum Objektträger gerichtet „flach präpariert“ und eingedeckelt. Um das Austrocknen der Präparate zu verhindern wurde das Deckgläschen mit Nagellack umrandet.

Ältere Stadien wurden meistens in einem Tropfen Glycerin auf einem Hohlschliff-Objektträger orientiert und uneingedeckelt fotografiert.

### **2.8.2 Einbettung in Durcupan**

Einbettungen in Durcupan dienen zur Herstellung von Dauerpräparaten oder histologischen Schnitten.

- Embryonen jeweils 10' bei RT auf dem Schüttler in 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % entwässern
- 2 x 10' in 100 % EtOH
- 2 x 15' in Aceton
- ü.N. in einem Eppendorf-Zentrifugenröhrchen bei offenem Deckel in einem 1:1-Gemisch aus Aceton / Durcupan (Firma Fluka) inkubieren
- zur endgültigen Einbettung in frisches Durcupan überführen

### **2.8.3 Gelatine-Beschichtung von Objektträgern**

Objektträger wurden kurz unter fließendem Wasser gespült, 5' in H<sub>2</sub>O gestellt, 2 x kurz in 96 % EtOH gewaschen und getrocknet. Danach wurden sie kurz in 0,5 % (w/v) Gelatine-Lösung getaucht und wieder getrocknet.

#### **2.8.4 Histologische Schnitte**

Semidünnschnitte (2-15 µm) wurden mit einem Glasmesser an einem LKB Ultratom (*ULTROTOME III*<sup>®</sup>) hergestellt, auf Gelatine-beschichtete Objektträger überführt und auf einer Heizplatte getrocknet. Ungefärbte Schnitte wurden je nach Dicke für 30-60'' mit einer Methylenblau / Toluidinblau – Färbelösung gefärbt. Die Färbelösung wurde mit H<sub>2</sub>O abgewaschen, die Objektträger erneut getrocknet und die Schnitte in Durcupan eingedeckelt.

### **2.9 Fluoreszenz-Beobachtungen an lebenden Zebrafisch-Embryonen und –Larven**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum Teil transgene Fische verwendet, die das aus der Qualle stammende „Green Fluorescent Protein“ (GFP) exprimieren. Die Fluoreszenz wurde unter einem Leica-Stereomikroskop (*MZ FLIII*) mit Fluoreszenzlampe und einem speziellen gfp-Filter beobachtet. Identifizierte Individuen, die das Protein exprimieren, wurden auf einen Hohlschliff-Objektträger in Methylzellulose überführt. Bei älteren Stadien (ab. 18 Stunden) wurden der Lösung einige Mikroliter Mesab hinzugefügt, um unerwünschte Bewegungen zu unterbinden. Sollten Beobachtungen an Individuen gemacht werden, die älter als 30 Stunden waren, so wurden die Embryonen ab ca. 18 Stunden in einer PTU-haltigen Lösung gehalten (0,003 % 1-Phenyl-2-thiourea in Zebrafischringer), wodurch die Pigmentierung verhindert wird. Die Aufnahmen der fluoreszierenden Organismen wurden mit Hilfe des Programs *Diskus* für den IBM-PC erstellt.

## 2.10 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zahlreiche DNA-Konstrukte verwendet und hergestellt, die im folgenden kurz aufgelistet sind. Vektoren, die ausschließlich zur Herstellung von *in situ*-Sonden dienen, sind in Kapitel 2.9.2 näher beschrieben.

Verwendete Plasmide:

Name des Vektors	erhalten von	verwendet für	kurze Beschreibung (Referenz)
pBsKS+	Stratagene	Grundvektor für alle Klonierungen	
pBs GAL4	selbst hergestellt	Grundvektor zur Herstellung sämtlicher Aktivatorstrukture	<i>gal4</i> -ORF fusioniert mit SV40polyA-Signal und Polylinker zum Einklonieren verschiedener Promotoren (Scheer, 1996)
pBs MAR cmvtk GAL4	selbst hergestellt	Herstellung von Aktivatorlinien	<i>gal4</i> unter Kontrolle des zusammengesetzten viralen Promotors cmvtk; eine MAR-Sequenz 5' des Promotors (Scheer, 1996).
pBs MAR svtk-GAL4	selbst hergestellt	Herstellung von Aktivatorlinien	<i>gal4</i> unter Kontrolle des zusammengesetzten viralen Promotors cmvtk; eine MAR-Sequenz 5' des Promotors (Scheer, 1996)
pBs MAR carp $\beta$ -actin GAL4	selbst hergestellt	Herstellung von Aktivatorlinien	<i>gal4</i> unter Kontrolle des $\beta$ -actin Promotors aus Karpfen; eine MAR-Sequenz 5' des Promotors (Scheer, 1996)
pBs 2xMAR carp $\beta$ -actin GAL4	selbst hergestellt	Herstellung von Aktivatorlinien	<i>gal4</i> unter Kontrolle des $\beta$ -actin Promotors aus Karpfen; eine MAR-Sequenz 5' des Promotors eine 3' des polyA-Signals (Scheer, 1996)
EF- $\beta$ gal	S. Lin	Elution des <i>Xenopus</i> <i>ef1</i> -Promotors	<i>lacZ</i> unter Kontrolle eines 4,5 kb-Fragmentes des <i>Xef1</i> -Promotors (Krieg et al. 1989)
pZHSP70	J. Kuwada	Elution des Zebrafisch <i>hsp70</i> -Promotors	1,5 kb-Fragment des <i>Zf hsp70</i> -Promotors in einem Klonierungsvektor
pBs14lacZ	S. Hans	Elution des Zebrafisch <i>deltaD</i> -Promotors	<i>lacZ</i> unter Kontrolle eines 14 kb-Fragmentes des <i>Zf deltaD</i> Promotors
RSVGAL4-Short	F. Argenton	Elution des GALAD1-Fragmentes	enthält eine Sequenz, die für ein Fusionsprotein der DNA-bindenden Domäne von GAL4 und der AD1-Transaktivierungsdomäne des Maus E12-Gens kodiert
pN5xUASg-Luc	F. Argenton	Benutzung der UAS-Sequenz mit Adenovirus E1b-Minimalpromotor	Luziferase unter Kontrolle von 5 optimierten Kopien der UAS-Sequenz und des TATA-Box Bereiches des Adenovirus E1b-Promotors
pBs UAS	selbst hergestellt	Grundvektor mit SV40polyA-Signal für Effektorstrukture	enthält UAS-Sequenz und SV40polyA-Signal mit Polylinker dazwischen (Scheer, 1996)
pCS2+MTZFNIC	P. Dornseifer	Elution von <i>mycNotch:intra</i>	enthält Sequenz, die für ein Fusionsprotein von 6 <i>myc</i> -Epitopen mit der intrazellulären Domäne von Zebrafisch <i>Notch1b</i> kodiert (Takke et al., 1999)
pBs her4	T. Takke	Elution von <i>Zf her4</i>	enthält 450 bp ORF von <i>her4</i>
phh	P. Ingham	Elution von <i>Zf shh</i>	enthält 840 bp ORF von <i>sonic hedgehog</i> , einen 250 bp 5' leader und 600 bp 3' trailer (Krauss et al. 1993)
pBs gfp SV(A)n	S. Hans	Elution von <i>gfp</i>	enthält 0,7 kb <i>gfp</i> -Fragment ( <i>mut2</i> ) (Cormack et al., 1996)
pCAB.PL	A. Bachmann	Elution von <i>lacZ</i>	enthält 3,5 kb <i>lacZ</i> -Fragment
pBsMAR	selbst hergestellt	Benutzung der MAR-Sequenzen	enthält 2,95 kb-Fragment der „Matrix Attachment Region“ des Hühnchen Lysozym-Lokus (Phi-Van und Strätling, 1988)

Folgende Plasmide wurden hergestellt:

Name des Vektors	Art der Herstellung	verwendet für
pBs ef1_GAL4	4,5 kb BglII/XbaI ef1_Promotor-Fragment aus EF- $\beta$ gal ausgeschnitten, XbaI-Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt (fill in) und das Fragment in BamHI/EcoRI(fill in) von pBs-GAL4 einkloniert	Herstellung von Akitvatorlinien
pzHSP70 GAL4	3,6 kb SmaI/Asp718 GAL4-SV40polyA-Fragment aus pBsGAL4 ausgeschnitten und in EcoRV/Asp718 von pzHSP70 einkloniert	Herstellung von Akitvatorlinien
pzHSP70 GAL short	1,75 kb HindIII(fill in)/BamHI(fill in) GALAD1-Fragment aus RSVGAL4-Short ausgeschnitten und in EcoRV von pzHSP70 einkloniert	Herstellung von Akitvatorlinien
pBs delta14 GAL4	3,6 kb SmaI/Asp718 GAL4-SV40polyA-Fragment aus pBsGAL4 ausgeschnitten und in ClaI(fill in)/Asp718 von pBs 14 lacZ einkloniert (lacZ fällt dabei heraus)	Herstellung von Akitvatorlinien
pN5xUASg-Notch:intra	2,3 kb BamHI/Asp718 mycNotch:intra-Fragment aus pCS2+MTNIC ausgeschnitten und in BamHI/Asp718 von pN5xUASg-Luc einkloniert (Luziferase fällt dabei heraus)	Ausgangsvektor für weiteren Effektorstrukture
pBsUAS E1b Notch:intra	2,5 kb HindIII/Asp718(fill in) UAS E1b-mycNotch:intra-Fragment in HindIII/EcoRI(fill in) von pBsUAS einkloniert (UAS des pBsUAS-Vektors fällt dabei heraus)	Ausgangsvektor für weiteren Effektorstrukture
pBsUAS E1bII Notch:intra	Da der Vektor pBsUAS E1b Notch:intra keinen Transkriptionsstart enthält, wurde ein synthetisches Oligonucleotid hergestellt, das den Transkriptionsstart des Carp $\beta$ -actin Promotors enthält. Dieses wurde in die ClaI-Schnittstelle des Vektors pBsUAS E1b Notch:intra einkloniert. Dadurch kommt der Transkriptionsstart 25 bp 3' von der TATA-Box des E1b-Promotors zu liegen (näher beschrieben in Kapitel 2.4.11)	Ausgangsvektor für weiteren Effektorstrukture
pBs2xMAR	pBsMAR mit BamHI geschnitten, Enden aufgefüllt und religiert (pBsMAR_Bam); 2,95 kb XbaI MAR-Fragment aus pBsMAR_Bam ausgeschnitten und in SpeI von pBsMAR einkloniert	Vektor zur Herstellung von Konstrukten, die von 2 MAR-Sequenzen flankiert werden
pBs2xMAR Notch:intra	3,3 kb HindIII(fill in)/Asp718(fill in) UAS-E1bII-Notch:intra-SV40polyA-Fragment aus pBsUAS. E1bII Notch:intra in BamHI(fill in) von pBs2xMAR einkloniert	Herstellung von Effektorlinien und Ausgangsvektor für andere Effektorstrukture
pBs2xMAR her4	0,45 kb EcoRI(fill in) her4-Fragment aus pBs her4 in SmaI von pBs2xMAR Notch:intra kloniert (mycNotch:intra fällt heraus)	Herstellung von Effektorlinien
pBs2xMAR gfp	0,7 kb XbaI(fill in)/HindIII(fill in) gfp-Fragment aus pBs gfp SV(A) <sub>n</sub> in SmaI von pBs2xMAR Notch:intra kloniert (mycNotch:intra fällt heraus)	Herstellung von Effektorlinien
pBs2xMAR lacZ	3,5 kb SalI(fill in)/XbaI(fill in) lacZ-Fragment aus pCAB.PL in SmaI von pBsUAS E1bII Notch:intra kloniert (mycNotch:intra fällt heraus) (pBsUAS E1bII lacZ); 4,4 kb NotI(fill in)/Asp718 (fill in) UAS-E1bII-lacZ-SV40polyA-Fragment aus pBsUAS E1bII lacZ in BamHI(fill in) von pBs2xMAR einkloniert	Herstellung von Effektorlinien
pBsUAS E1bII shh	1,7 kb EcoRI(fill in) shh-Fragment aus pHH in SmaI/BglII(fill in) von pBsUAS E1bII Notch:intra einkloniert	Herstellung von Effektorlinien

## **2.11 Molekularbiologische Methoden:**

### **2.11.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Analytische Restriktionsverdau zur Charakterisierung von Plasmid-DNA wurden in Endvolumina von 10-20 µl durchgeführt, präparative Totalverdau in Endvolumina von 50-200 µl. Die Inkubation erfolgte für 1-2 Stunden bei für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur- und Pufferbedingungen (beides laut Herstellerangaben).

### **2.11.2 Auffüllen 5'-überhängender Enden von DNA-Fragmenten**

Während die meisten Klonierungsschritte über kohäsive Enden („sticky ends“) erfolgten, war es manchmal notwendig, die Enden von zu ligierenden DNA-Fragmenten durch eine Auffüllreaktion kompatibel zu machen („blunt ends“). Hierzu wurde das „Klenow-Fragment“ der Polymerase I aus E.coli verwendet, welches die Fähigkeit besitzt, die komplementären Nucleosidtriphosphate (dNTPs) an 5'-überhängenden Enden einzufügen. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 30 µl unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 µg DNA; 0,5 mM dNTPs; 1 x Klenow-Puffer; 1 U Klenow-Enzym. Inkubation: 30' auf Eis. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C inaktiviert und die DNA durch Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt.

### **2.11.3 Dephosphorylierung von Vektorenden**

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektorenden zur Vermeidung von Religation erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). 1 U Enzym wurde dem Restriktionsansatz direkt zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Phosphatase 15 min bei 70°C inaktiviert und die DNA durch Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt.



#### **2.11.4. Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen**

DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in 0,8-1,2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden mit Hilfe einer sauberen Rasierklinge auf einem UV-Tisch ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *JETsorb* DNA-Extraktionskits (*Gel Extraction Kit / 300*) der Firma Genomed entsprechend der Herstellerangaben eluiert.

#### **2.11.5 DNA-Mengenbestimmung**

In der Regel wurde die DNA-Menge durch Agarosegel-Elektrophorese abgeschätzt, wobei eine 1 kb-Leiter von Gibco/BRL mit bekannter Konzentration als Referenz diente.

#### **2.11.6 Ligation von DNA-Fragmenten**

Ligationen erfolgten durch das Enzym T4-DNA-Ligase (Roche). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl durchgeführt. Es wurden 100-200 ng geschnittene und mit CIP behandelte Vektoren eingesetzt. Die zu klonierenden Restriktionsfragmente wurden in einem dreifachen molaren (sticky ends) bzw. zehnfachen molaren (blunt ends) Überschuß hinzugegeben. Die Reaktionen wurden bei 16°C ü.N. unter den empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt. Bei „blunt end“-Ligationen wurden, anstelle der sonst üblichen 1 U Ligase, 2-3 U des Enzyms eingesetzt.

### 2.11.7 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Plasmide wurden durch Elektroporation in Bakterien transformiert. Als transformationskompetente Bakterien wurde der E.coli-Stamm DH5<sub>+</sub> (Hanahan,1985) verwendet. Die Herstellung erfolgte nach folgendem Verfahren:

- Animpfen von 1 l LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur im Verhältnis 100:1
- Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1
- 15-20 min auf Eis kühlen
- 15 min bei 4°C und 4000 rpm in einem GSA-Rotor zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 0,5 l kaltem bidestillierten Wasser lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 20 ml 10 % Glycerin / H<sub>2</sub>O lösen
- Erneut zentrifugieren (siehe oben)
- Pellet in 2-3 ml 10 % Glycerin / H<sub>2</sub>O lösen
- Suspension in 40 µl Aliquots aufteilen und in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Lagerung bei -70°C

Für die Transformation wurden die Bakterien langsam auf Eis aufgetaut, mit 0,5-2 µl der gewünschten Plasmid-DNA gemischt und in, auf Eis gekühlte, 0,2 cm Elektroporationsküvetten überführt. Die Küvette wurde in einen *Gene Pulser*<sup>TM</sup> (Biorad) gestellt und es wurde für 4-5 ms eine Feldstärke von 12,5 kV / cm angelegt (Geräteinstellung: Kapazität 25 µF; Spannung 2,5 kV; Widerstand 200 Ω). Anschließend wurde die Küvette schnell entnommen, 1 ml bei 37°C vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz für ca. 30 min bei 37°C belassen. Schließlich wurde ein geeignetes Volumen auf selektive Agarplatten (LB-Agarplatten mit 50 µg Ampicillin / ml) ausplattiert und bei 37°C ü.N. inkubiert.

### **2.11.8 Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Zur schnellen analytischen Charakterisierung von Plasmiden in transformierten Bakterien wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Animpfen einer einzelnen Bakterienkolonie von Platte in ca. 2 ml LB / Amp-Medium
- Inkubation in einem Roller bei 37°C ü.N.
- Bakterienkultur bei 13000 rpm für 30 sec in Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugieren
- Überstand absaugen und Pellet in 250 µl STET-Puffer lösen
- 2 min im Wasserbad kochen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit sterilem Zahnstocher entfernen
- Fällung der DNA durch Zugabe von 200 µl eines 1:4-Gemisches aus 10 M NH<sub>4</sub>OAc / Isopropanol
- 5-10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet mit 70 % Ethanol waschen und unter Tischlampe trocknen
- Pellet in 50-100 µl H<sub>2</sub>O / RNase A (50 µg / ml) lösen
- Charakterisierung der DNA durch geeignete Restriktionsanalyse

### **2.11.9 Midi-Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Isolierung größerer DNA-Mengen für präparative Zwecke wurde das *Jet Star 2.0, Plasmid Midi Prep Kit* der Firma Genomed verwendet, wobei entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen wurde.

### **2.11.10 Sequenzierung von DNA-Konstrukten**

Die Sequenzierung von DNA-Konstrukten wurde entweder mit Standardprimern (T3, T7, SP6) oder mit, für das jeweilige Konstrukt, spezifischen Primern durchgeführt. Für die Sequenzreaktion wurde das DNA-Sequenzierungskit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems unter Beachtung der Herstellerangaben verwendet. Als automatischer Sequenzierer stand das Modell ABI 3.77 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems zur Verfügung.

Die Verarbeitung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der *Lasergene / DNASTAR-Biocomputing* Software der Firma DNASTAR, INC., Madison Wisconsin.

### 2.11.11 Einklonieren eines synthetischen Oligonukleotides in einen Vektor

In den Vektor pBsUAS E1b Notch:intra (siehe Kapitel 2.3) wurde ein synthetisches Oligonukleotid einkloniert, um einen 25 bp 3' der TATA-Box des E1b-Promotors gelegenen Transkriptionsstart zu erzeugen. Der daraus resultierende Vektor pBsUAS E1bII Notch:intra wurde folgendermaßen hergestellt:

- bei der Firma Eurogentec wurden zwei synthetische Oligonukleotide (ClaI/ClaII) bestellt:

ClaI: 5'-CGCGTCTCAGCCTCACTTTGAGCTCCTCCACACGAATTCCTGGGAT-3'

ClaII: 5'-CGATCCCGGGAATTCGTGTGGAGGAGCTCAAAGTGAGGCTGAGACG-3'

- Oligos mit einer Konzentration von 2 mg / ml in H<sub>2</sub>O lösen und folgenden Reaktionsansatz für die Anlagerung („annealing“) der beiden Oligos herstellen: 0,5 µl je Oligonucleotid-Lösung + 49 µl Tris HCl, pH 8,0
- 4' auf 95 °C erhitzen und langsam im Heizblock abkühlen lassen
- bei einer Temperatur von 30°C auf Eis stellen und 50 µl Tris HCl, pH 8,0 hinzufügen
- mit dieser Lösung einen Ligationansatz herstellen, in dem das synthetische Oligonukleotid in einem 100fach molaren Überschuß zu ClaI-geschnittenem pBsUAS E1b Notch:intra – Vektor vorliegt und in beschriebener Weise ligieren

Anmerkung: die Oligonukleotide wurden gewählt, das bei vollständiger Basenpaarung Einzelstrangüberhänge entstehen, die zu ClaI-geschnittener DNA kompatibel sind. Die DNA-Sequenz entspricht dem Bereich des Transkriptionsstarts des Carp *β-actin* Promotors (Caldovic und Hackett, 1995). Desweiteren sind außerhalb dieses Bereiches Restriktionsschnittstellen enthalten, die für weitere Klonierungsschritte verwendet wurden.

### 2.11.12 Western-Blot-Analyse

Western-Blot Analysen wurden zum Nachweis von Proteinen in Zebrafischembryonen durchgeführt. Die Protein-Extraktion erfolgte nach einem Protokoll aus dem *Zebrafischnotebook* (Seite 9.1). Dabei wurde im Wesentlichen folgendermaßen vorgegangen:

- Entfernung des Chorions durch 5 minütige Pronasebehandlung bei RT (1 mg Pronase / ml ZFR)
- 3 x kurz mit ZFR waschen
- in SDS-Puffer homogenisieren
- 1' im Wasserbad kochen
- 5' bei 13.000 rpm zentrifugieren

Der Überstand wurde auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine für 2 h bei 12,5 A aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe des Gerätes *Power Pac 2000* der Firma BIO RAD für 30' bei 10 V in Transfer-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin; 0,037 % SDS; 20 % MeOH) auf Nitrozellulose Membranen transferiert. Die Membranen wurden wie folgt weiterbehandelt:

- 1 h mit 10 % Milchpulver in TTBS (20 mM Tris; 500 mM NaCl; 0,05 % Tween 20; pH 7,5) blocken
- ü.N. bei 4°C mit dem für das zu untersuchende Protein spezifischen Antikörper inkubieren
- 3 x 10' bei RT mit TTBS waschen
- 1 h bei RT mit dem für den 1. Antikörper spezifischen 2. Antikörper inkubieren
- 3 x 10' bei RT mit TTBS waschen

Färbung mit NBT / BCIP auf die in Kapitel 2.9.2 beschriebene Weise

## 2.12 Abkürzungen, Symbole und Konventionen

AP	–	alkalische Phosphatase
BCIP	–	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	–	Basenpaar(e)
BSA	–	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
cDNA	–	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
DAB	–	Diaminobenzidin
DEPC	–	Diethylpyrocarbonat
Dig	–	Digoxygenin
DTT	–	Dithiothreitol
EDTA	–	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
h	–	Stunde
HEPES	–	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N`-(2-Ethan)-Sulfonsäure
kB	–	Kilobasenpaare
kDa	–	Kilodalton
LB	–	Luria Bertani-Medium
min	–	Minute
mRNA	–	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
NBT	–	Nitro-Blue-Tetrazolium
OD	–	optische Dichte
PCR	–	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PBS	–	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBT	–	PBS mit Tween 20
PFA	–	Paraformaldehyd
rpm	–	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	–	Raumtemperatur
SDS	–	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	–	Sekunden
SSC	–	<i>standard saline citrate</i>
TAE	–	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Tris	–	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	–	Einheit ( <i>unit</i> )
ü.N.	–	über Nacht
UV	–	ultraviolette Strahlung
X-Gal	–	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid
`	–	Minute(n)
``	–	Sekunde(n)

Genetische Nomenklatur in dieser Arbeit: Gene, -mRNAs und -Phänotypen klein und kursiv. Proteine nicht-kursiv und Anfangsbuchstaben groß.

Bezeichnung von Entwicklungsstadien beim Zebrafisch: Die Einteilung und Bezeichnung jüngerer Stadien erfolgte im Wesentlichen nach den Kriterien von Kimmel et al. (Kimmel et al., 1995). Bei älteren Stadien wurde die Zeit nach der Befruchtung unter standardisierten Aufzuchtbedingungen zur Bezeichnung eines Stadiums verwendet. Da sich selbst unter diesen Bedingungen nicht alle Individuen genau gleich schnell entwickeln (Kimmel et al., 1995),

mag es zu leichten Unterschieden im Alter zweier Vergleichstiere kommen. Da in dieser Arbeit aber in allen Fällen mit einer relativ großen Zahl von Nachkommen gearbeitet werden konnte, sollten sich solche Unterschiede über die betrachtete Organismenzahl herausmitteln. Zeitangaben zur Bezeichnung eines Entwicklungsstadiums beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, immer auf den Zeitpunkt der Befruchtung. In Fällen bei denen der Ausdruck Larve verwendet wurde, müssen drei Tage zur Berechnung der seit der Befruchtung vergangenen Zeit hinzugezählt werden, da Larven mit ca. drei Tagen aus dem Chorion schlüpfen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung stabiler transgener Insertionen

Die in Tabelle 3.1 aufgelisteten DNA-Fragmente wurden zur Herstellung transgener Insertionen aus dem jeweiligen Vektor eluiert:

verwendeter Vektor	zum Ausschneiden verwendete Enzyme	vollständige Beschreibung des eluierten Fragmentes ( <b>Kurzbezeichnung</b> )	Fragment Größe
pBs MAR <i>cmv</i> tk GAL4	NotI/Asp718	MAR – <i>cmv</i> tk - <i>gal4</i> - SV40(A) <sub>n</sub> ( <b><i>cmv</i>tk-GAL4</b> )	7,5 kb
pBs MAR <i>svt</i> k-GAL4	NotI/Asp718	MAR – <i>svt</i> k - <i>gal4</i> - SV40(A) <sub>n</sub> ( <b><i>svt</i>k-GAL4</b> )	7,0 kb
pBs MAR <i>carp</i> $\beta$ -actin GAL4	NotI/Asp718	MAR - <i>Carp</i> $\beta$ -actin - <i>gal4</i> - SV40(A) <sub>n</sub> ( <b><i>carp</i> <math>\beta</math>-actin-GAL4</b> )	9,0 kb
pBs 2xMAR <i>carp</i> $\beta$ -actin GAL4	NotI/Asp718	MAR - <i>Carp</i> $\beta$ -actin - <i>gal4</i> - SV40(A) <sub>n</sub> - MAR ( <b>2MAR <i>carp</i> <math>\beta</math>-actin-GAL4</b> )	12,0 kb
pBs <i>ef1</i> GAL4	NotI/Asp718	<i>Xef1</i> - <i>gal4</i> - SV40(A) <sub>n</sub> ( <b><i>ef1</i> -GAL4</b> )	8,1 kb
pzHSP70 GAL4	BamHI/Asp718	<i>hsp70</i> - <i>gal4</i> - SV40(A) <sub>n</sub> ( <b><i>hsp</i>-GAL4</b> )	5,1 kb
pzHSP70 GAL short	BamHI/Asp718	<i>hsp70</i> – <i>galad1</i> - SV40(A) <sub>n</sub> ( <b><i>hsp</i>-GALAD1</b> )	3,2 kb
pBs <i>delta14</i> GAL4	XbaI/Asp718	<i>deltaD</i> (6 kb) - <i>gal4</i> - SV40(A) <sub>n</sub> ( <b><i>did</i>-GAL4</b> )	9,6 kb
pBs2xMAR Notch:intra	NotI/Asp718	MAR – UAS <i>elbII</i> - <i>myc notch:intra</i> – SV40(A) <sub>n</sub> – MAR ( <b>UAS-<i>mycNIC</i></b> )	9,2 kb
pBs2xMAR <i>her4</i>	NotI/Asp718	MAR – UAS <i>elbII</i> - <i>her4</i> – SV40(A) <sub>n</sub> – MAR ( <b>UAS-<i>her4</i></b> )	7,2 kb
pBs2xMAR <i>gfp</i>	NotI/Asp718	MAR – UAS <i>elbII</i> - <i>gfp</i> – SV40(A) <sub>n</sub> – MAR ( <b>UAS-<i>gfp</i></b> )	7,5 kb
pBs2xMAR <i>lacZ</i>	NotI/Asp718	MAR – UAS <i>elbII</i> - <i>lacZ</i> – SV40(A) <sub>n</sub> – MAR ( <b>UAS-<i>lacZ</i></b> )	10,3 kb
pBsUAS <i>E1bII</i> <i>shh</i>	HindIII/Asp718	UAS <i>elbII</i> - <i>shh</i> – SV40(A) <sub>n</sub> ( <b>UAS-<i>shh</i></b> )	2,6 kb

**Tabelle 3.1:** Auflistung aller Vektoren, die für die Herstellung transgener Linien verwendet wurden, der für das Ausschneiden der zu injizierenden DNA-Fragmente aus den Vektoren verwendeten Restriktionsenzyme, der Sequenzbestandteile der injizierten DNA-Fragmente und der Größen der Injektionsfragmente. Die in fett gedruckten Kurzbezeichnungen werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Charakterisierung der jeweiligen Fragmente benutzt.

Die eluierten DNA-Fragmente wurden in das Cytoplasma einer befruchteten Eizelle injiziert, die Fische aufgezogen und die Nachkommenschaft mittels PCR-Analyse auf das Vorhandensein der Fremd-DNA untersucht. Wie in Tabelle 3.2 zu sehen ist, war es für jedes der getesteten Konstrukte möglich, stabile Insertionen zu erzeugen. Die Insertionsfrequenz schwankte dabei in Abhängigkeit von den verwendeten Sequenzen in einem Bereich zwischen



3 – 29 % der gesichteten adulten Fische. Für jedes Konstrukt wurde mehr als eine unabhängige Insertion erzeugt.

injiziertes Konstrukt	Zahl der gesichteten Fische*	Zahl der transgenen Insertionen (Insertionsfrequenz)**	Bezeichnung der transgenen Insertionen
cmvtk-GAL4	104	4 (4 %)	23;24;60;92
svtk-GAL4	73	2 (3 %)	16;73
carp $\beta$ -actin-GAL4	123	6 (5 %)	6;68;80;85;90;95
2MAR carp $\beta$ -actin-GAL4	32	3 (9 %)	18;68
ef1_-GAL4	50	7 (14 %)	3;10;104;110;118;131;154
hsp-GAL4	44	3 (7 %)	6;13;15
hsp-GALAD1	46	2 (4 %)	2;14
dID-GAL4	58	7 (12 %)	28;38;56;58;78;104;106
UAS-mycNIC	60	5 (8 %)	5;18;19;34;73
UAS-her4	44	8 (18 %)	2;13;36;46;50;56;61;77
UAS-gfp	35	10 (29 %)	9;29;30;31;32;35;43;46;47;61
UAS-lacZ	35	5 (14 %)	18;27;30;39;51
UAS-shh	42	6 (14 %)	7;8;28;36;47;63

**Tabelle 3.2:** Auflistung aller transgener Insertionen, die mit den verschiedenen DNA-Konstrukten erzeugt wurden und die Bezeichnung der Insertionen.\*Ein Fisch wurde als gesichtet angesehen, wenn mindestens 80 Nachkommen mittels PCR getestet wurden.\*\*Ein Fisch wurde als Keimbahn-Transgen angesehen, wenn PCR-Analysen auf zwei unabhängigen DNA-Extraktionen von Nachkommen positive Signale erzeugten

### 3.2 Weitervererbung der transgenen DNA

Aus vorherigen Arbeiten war bekannt, dass aufgrund des Keimbahnmosaizismus in adulten Gründerfischen ( $F_0$ ) nur ein Teil von deren Nachkommen das Transgen trägt. Die von anderen Gruppen beobachtete Schwankung der Keimbahntransmissionsrate konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden (Tabelle 7.1 im Anhang). Die Schwankung lag in einem Bereich von 1 - 54 % transgener  $F_1$ -Nachkommen eines PCR-positiven Gründerfisches.

Der Anteil transgener Nachkommen aus Kreuzungen eines PCR-positiven  $F_1$ -Fisches mit einem wildtypischen Fisch lag in allen getesteten Fällen bei ca. 50 %, so dass das Transgen entsprechend der Mendelschen Regeln weitervererbt wurde. Auch in folgenden Generationen wurde das Transgen in dieser Weise vererbt. In manchen Fällen wurde dessen Transmission bis in die fünfte Generation verfolgt ohne dass eine Abweichung von den Vererbungsregeln festgestellt wurde.

### 3.3 Verteilung des *gal4*-Transkriptes bei unterschiedlichen Aktivatoren

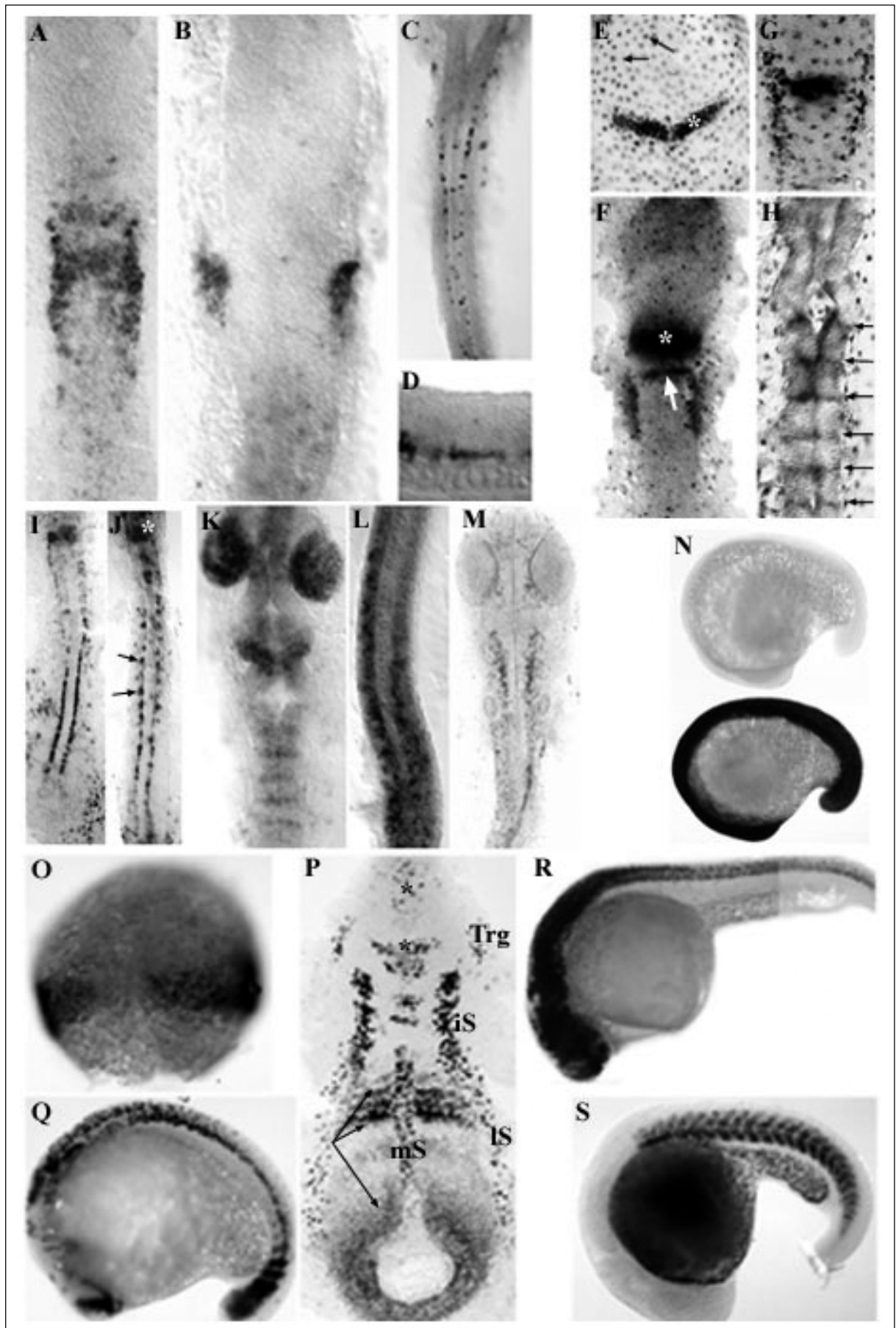
Um eine Vorstellung von der räumlichen und zeitlichen Verteilung der *gal4*-RNA in den transgenen Embryonen, die *gal4* unter Kontrolle eines Promotors tragen, zu bekommen, wurden *whole mount in situ* Hybridisierungen an unterschiedlichen Stadien durchgeführt. In Abhängigkeit von dem verwendeten Promotor ergaben sich dabei folgende Ergebnisse:

- *cmvtk*-Promotor: Die Verteilung des *gal4*-Transkriptes in transgenen Embryonen mit diesem Promotor wurde bei 6 Somiten, 16 Somiten und 24 Stunden untersucht. In jungen Stadien läßt sich eine diffuse Expression wahrscheinlich im Bereich der Hinterhirn-Anlage nachweisen (Abb. 3.1A), während bei 16 Somiten eine relativ scharfe Expression in der otischen Plakode zu beobachten ist (Abb. 3.1B). Bei 24 Stunden exprimieren vereinzelte Zellen im ventralen Bereich des Neuralrohrs *gal4*-RNA (Abb. 3.1C,D). Diese Zellen könnten von ihrer Lage her Motoneurone sein.
- *svtk*-Promotor: Im 1 Somiten-Stadium läßt sich ein transversaler Streifen im anterioren Bereich des Embryos nachweisen (Abb. 3.1E), der mindestens bis zum 6 Somiten-Stadium erhalten bleibt (Abb. 3.1F). Doppelfärbungen im 6 Somiten-Stadium mit dem Marker *pax2*, der unter anderem die Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze färbt (Krauss et al., 1991), zeigen, dass dieser Streifen unmittelbar posterior der von *pax2* markierten Grenze und somit in der Anlage des Hinterhirns liegt (Abb. 3.1F). Bei 16 Somiten lassen sich nunmehr zwei Expressionsdomänen im Bereich des entstehenden Hinterhirns detektieren (Abb. 3.1G). Dabei handelt es sich um einen weiter ventral gelegenen transversalen Streifen, der wahrscheinlich mit der bereits beschriebenen frühen Expressionsdomäne verwandt ist, und zwei weiter dorsal befindliche longitudinale Streifen. Die genaue Lage dieser Expressionsdomänen wurde nicht bestimmt. Mit 22 Stunden sind 6 deutlich getrennte transversale Streifen im Hinterhirn zu erkennen, die aufgrund ihrer Lage die Grenzen der Rhombomeren markieren könnten (Abb. 3.1H). Über den gesamten betrachteten Entwicklungszeitraum ist außerdem eine starke Färbung der Zellen der Hüllschicht (enveloping layer, *evl*) zu beobachten (Abb. 3.1E-H).
- *Carp β-actin*-Promotor: *In situ* Färbungen an transgenen Embryonen mit diesem Promotor wurden zwischen frühen Somiten-Stadien und 24 Stunden durchgeführt. Bei 9, 12 und 18 Somiten läßt sich ein Signal in Zellen nachweisen, die unmittelbar lateral entlang des Notochords liegen (Abb. 3.1I,J). Aufgrund ihrer Morphologie und Lage, lassen sie sich als Zellen des adaxialen Mesoderms identifizieren, die zum Teil später weiter nach lateral wandern und die langsame Muskulatur bilden (Devoto et al., 1996). Einige dieser Zellen dienen als Vorläufer für weitere Muskelzellen (Devoto et al., 1996). Desweiteren lassen sich

in transversalen Streifen organisierte Expressionsdomänen beobachten, die wahrscheinlich im Hinterhirn liegen (Abb. 3.1I,J). Bei 24 Stunden läßt sich nur noch eine diffuse Färbung in den Somiten, im Hinterhirn und im Vorderhirn erkennen (nicht gezeigt).

- Xef1-Promotor: *gal4*-Transkripte lassen sich in transgenen Embryonen bei den meisten Insertionen mit diesem Promotor in allen Geweben nachweisen, allerdings ist die Expressionsstärke in verschiedenen Geweben sehr unterschiedlich. Eine relativ starke Expression ist in der Regel bei allen betrachteten Stadien in den Augen, in bestimmten Expressionsdomänen des Gehirns und in den Somiten zu beobachten (Abb. 3.1K,L). In anderen Bereichen des Embryos ist die Expression deutlich schwächer. Außerdem ist eine gewisse Heterogenität in der Expression zwischen unabhängigen Insertionen mit diesem Promotor zu beobachten. So zeigen beispielsweise transgene Embryonen mit der Insertion Nr.110 bei 24 Stunden eine spezifische Expression in einzelnen, nicht näher identifizierten Zellen des Hinterhirns (Abb. 3.1M).

**Abb. 3.1 (folgende Seite):** *gal4 in situ* Hybridisierungen an Embryonen mit transgenen Insertionen, bei denen *gal4* unter Kontrolle verschiedener Promotoren steht. (A-D) Embryonen mit der Insertion Nr. 60 des *cmv*tk-GAL4 Konstruktes. (A) 6 Somiten. (B) 16 Somiten. (C,D) 24 Stunden. (E-H) Embryonen mit der Insertion Nr.73 des *svtk*-GAL4 Konstruktes. (E) 1 Somiten-Stadium. Die Pfeile markieren die *gal4*-RNA Expression in den Zellen der Hüllschicht und der Stern die Expression in einem transversalen Streifen in der Anlage des Hinterhirns. (F) *pax2* (rot) / *gal4* (blau) Doppelfärbung bei 6 Somiten. Der Stern markiert die *pax2*-Expression in der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze, der Pfeil die *gal4*-Expression posterior davon. (G) 16 Somiten. (H) 22 Stunden. Die Pfeile deuten auf transversale Streifen im Hinterhirn, die die Grenzen der Rhombomeren markieren könnten. (I,J) Embryonen mit der Insertion Nr.95 mit dem *carp*  $\beta$ -actin-GAL4 Konstrukt. (I) 9 Somiten. (J) 18 Somiten. Die Pfeile markieren die Zellen des adaxialen Mesoderms, der Stern eine Expressionsdomäne im Hinterhirn. (K-M) Embryonen mit der Insertion Nr.10 (K,L) bzw. Nr. 110 (M) des *Xef1*-GAL4 Konstruktes. (K,L) 20 Stunden. (M) 24 Stunden. (N) Oben: Bei 16 Somiten hitzegeschoccker und 1 Stunde später fixierter wildtypischer Embryo. Unten: Gleichermaßen behandelter Embryo mit der Insertion Nr.13 des *hsp*-GAL4 Konstruktes. (O-S) Embryonen mit der Insertion Nr.58 (O-R) bzw. Nr. 78 (S) des *deltaD*-GAL4 Konstruktes. (O) 60 % Epibolie. (P) 3 Somiten. Die intermediären (iS), lateralen (lS) und medialen Streifen (mS) beiderseits der Mittellinie repräsentieren unterschiedliche Expressionsdomänen in der Anlage des Rückenmarks. Die Sterne markieren verschiedene Expressionsdomänen in der Anlage des Gehirns. Die Pfeile deuten auf die *gal4*-Expression im präsomitischen und somitischen Mesoderm und in der Schwanzknospe. Trg = Trigeminalganglion. (Q) 16 Somiten. (R) 24 Stunden. (S) 22 Stunden.



*hsp70*-Promotor: Bei Embryonen, die keinem Hitzeschock unterzogen wurden, lässt sich zwischen dem 1 Somiten-Stadium und 24 Stunden kein *gal4*-Transkript nachweisen. Embryonen, die für 30' bei 40°C hitzegeschockt wurden, exprimieren *gal4* hingegen ubiquitär (Abb. 3.1N). Die Expression ist dabei schon unmittelbar nach dem Hitzeschock nachzuweisen und sie hält für mindestens eine Stunde an. Danach ist ein deutliches Abfallen der Expressionsstärke zu beobachten und 4 Stunden nach dem Hitzeschock ist kein Transkript mehr nachzuweisen (nicht gezeigt).

- *deltaD*-Promotor: Die Expression der *gal4*-RNA unter Kontrolle des *deltaD*-Promotors scheint weitestgehend der Expression des endogenen *deltaD* (Dornseifer et al., 1997) zu entsprechen. Bei 60 % Epibolie lässt sich Transkript im marginalen Rand des gastrulierenden Embryos nachweisen, wobei der dorsalste Bereich ausgespart bleibt (Abb. 3.1O). Diese Expressionsdomäne bleibt in späteren Stadien in der Schwanzknospe erhalten (Abb. 3.1P). Bei 3 Somiten lässt sich Expression in verschiedenen neurogenen Regionen des Embryos nachweisen. Dazu gehört die Expression in verschiedenen Bereichen der Gehirnanlage und in drei longitudinalen Streifen in der Neuralplatte (Abb. 3.1P). Desweiteren ist die für *deltaD* typische Expression in der Schwanzknospe, im präsomitischen und im somitischen Mesoderm zu beobachten (Abb. 3.1P,Q). In späteren Stadien wird die *gal4*-RNA unter anderem im sich entwickelnden Auge exprimiert (Abb. 3.1R). In einem untersuchten Fall (Insertion Nr.78), weicht die *gal4*-Expression deutlich von der endogenen *deltaD*-Expression ab. Bei dieser Insertion ist das Transkript bei 22 Stunden ausschließlich in den Somiten zu beobachten (Abb. 3.1S).

Die Verwendung der hier beschriebenen Promotoren führte also mit wenigen Ausnahmen zu einer reproduzierbaren Expression der *gal4*-RNA bei unabhängigen transgenen Insertionen mit dem selben Konstrukt.

### **3.4 Relative Stärke der *gal4*-RNA-Expression in unterschiedlichen Aktivatoren**

Zwar erlauben die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung keine Aussagen über die absoluten Mengen an Transkript im Embryo und es wurde auch keine detaillierte Analyse der relativen Expressionsstärken der unterschiedlichen transgenen Insertionen durchgeführt. Dennoch kann anhand der vorliegenden Ergebnisse eine grobe Abschätzung der Stärke der *gal4*-RNA Expression in einem transgenen Organismus im Vergleich zu einem anderen angestellt

werden. Als Bewertungskriterium dient hierfür die Zeit, die bei der Detektion des *in situ* Signals vergeht bis eine deutliche Färbung zu erkennen ist. Dabei lassen sich folgende Aussagen machen:

- Die *gal4*-RNA-Expression in transgenen Embryonen, in denen *gal4* unter Kontrolle eines heterologen Promotors steht (*cmvtk*, *svtk*, Carp  $\beta$ -*actin*, *Xefl*\_) ist im Durchschnitt deutlich schwächer als in solchen, bei denen endogene Zebrafisch-Promotoren verwendet wurden (*deltaD*, *hsp70*).
- Sowohl im Fall der Verwendung heterologer wie auch bei der Benutzung endogener Promotoren gibt es erhebliche Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen unabhängigen Insertionen eines Konstruktes. Diese Unterschiede können soweit gehen, dass in einem Fall das *in situ* Signal schon nach wenigen Minuten sichtbar wird, während in einem anderen Fall viele Stunden dazu benötigt werden.
- Die schwächste Expression wurde für den *cmvtk*-Promotor beobachtet, für den bei allen erzeugten Insertionen das *in situ* Signal erst nach ca. einem Tag zu erkennen war. Während die Insertion Nr.16 mit dem *svtk*-Promotor keine erkennbare Expression zeigte, wurde das Signal bei der Insertion Nr.3 nach mehreren Stunden sichtbar. Dies galt generell auch für Insertionen mit dem Carp  $\beta$ -*actin*- und dem *Xefl*\_-Promotor, wobei folgende grobe Abstufungen in der Expressionsstärke bei den getesteten Insertionen beobachtet wurden: 68<18/95<6 (Carp  $\beta$ -*actin*) und 154<118<131<110<10<3 (*Xefl* \_). Die Expressionsstärke bei Insertionen mit dem *deltaD*-Promotor war bei unabhängigen Insertionen besonders heterogen. Während für die Insertion Nr.28 erst nach vielen Stunden ein *in situ* Signal detektiert werden konnte, war dieses für die Insertion Nr.3 bereits nach wenigen Minuten sichtbar. Bei der groben Einteilung ergab sich für Insertionen mit diesem Promotor folgende Abstufung: 28<106<38<78<58. In allen untersuchten Fällen mit Insertionen des *hsp70*-Promotors war die Expressionsstärke nach Hitzeschock der Embryonen sehr hoch. Das *in situ* Signal wurde hier je nach Temperatur und Dauer des Hitzeschocks in manchen Fällen bereits nach Sekunden sichtbar. Die Expressionsstärke dieses Promotors lässt sich scheinbar durch die Bedingungen des Hitzeschocks regulieren, wobei weiterführende Analysen notwendig sein werden, um diese Aussage genauer zu quantifizieren.

Alle hier und in Kapitel 3.4 beschriebenen Ergebnisse sind in Tabelle 72 im Anhang zusammengefasst.

### 3.5 Nachweis der Transaktivierungsfähigkeit der unterschiedlichen Aktivatoren und Bestätigung der prinzipiellen Funktionalität des GAL4-Systems im Zebrafisch

Um zu testen, ob die unterschiedlichen Aktivatoren in der Lage sind, die Expression eines Effektorgens unter der Kontrolle von UAS-Sequenzen zu transaktivieren, wurden die Aktivatoren gegen einen der UAS-mycNIC Effektoren (Insertion Nr.5 oder 34) gekreuzt und die Embryonen verschiedener Stadien einer Myc-Antikörperfärbung unterzogen. Da der verwendete Effektor für ein Fusionsprotein einer konstitutiv-aktiven Variante des Transmembranrezeptors Notch1a mit sechs Myc-Epitopen kodiert, kann so bestimmt werden, ob die Expression des Effektorgens in Anwesenheit von Gal4 angeschaltet wird und ob sie das *gal4*-RNA Expressionsmuster des Aktivators widerspiegelt. Mit den verfügbaren Effektorlinien hat sich diese Vorgehensweise im Laufe dieser Arbeit als sensitivste Methode des Nachweises auf Transaktivierungsfähigkeit erwiesen. Weder mit den UAS-gfp noch mit den UAS-lacZ Effektorlinien ließ sich eine vergleichbar niedrige Detektionsschwelle erreichen.

Diese Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

- Mit Ausnahme der Insertionen mit dem *cmvtk*Promotor ließ sich für jedes Aktivator-konstrukt mindestens eine Insertion in der Lage war, die Expression der Myc-Epitope zu induzieren. Mit einer Ausnahme (siehe unten) wurde das *gal4*-RNA Expressionsmuster des Aktivators reproduziert. Die prinzipielle Funktionalität des C Systems im Zebrafisch ist somit nachgewiesen.
- Bei manchen Insertionen, die eine relativ hohe *gal4*-RNA Expressionsstärke zeigen, ließ sich keine Transaktivierungsfähigkeit nachweisen, was wahrscheinlich auf die Abwesenheit eines funktionellen Gal4-Proteins zurückzuführen ist.
- Für die verschiedenen Konstrukte wurden bei Kreuzungen der entsprechenden transgenen Organismen mit dem UAS-mycNIC Effektor die in Tabelle 3.3 aufgelisteten Beobachtungen gemacht.

Konstrukt	Insertionen für die eine Trans-	Insertionen die keine
-----------	---------------------------------	-----------------------

	aktivierungsfähigkeit nachgewiesen werden konnte	nachweisbare Transaktivierungsfähigkeit besaßen
cmvtk-GAL4	-	6;23;92
svtk-GAL4	73	16
carp $\beta$ -actin-GAL4	6;80;68;95	90
2MAR carp $\beta$ -actin-GAL4	18	-
Xef1 <sub>-</sub> -GAL4	10;110	3
hsp-GAL4	13	-
hsp-GALAD1	2,14	-
dld-GAL4	28,38,58,106	78
	15	7

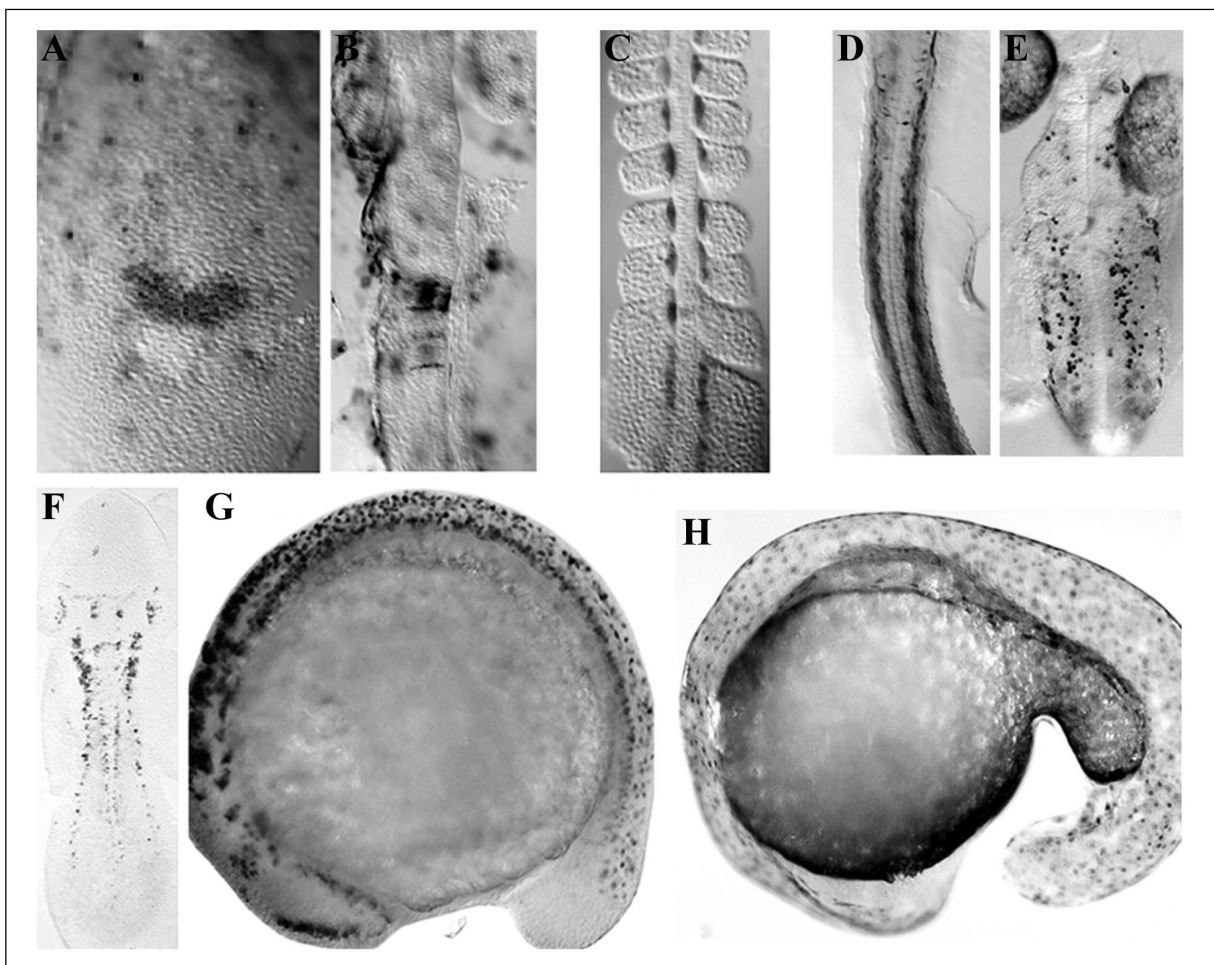
**Tabelle 3.3:** Untersuchung der unterschiedlichen Aktivatoren auf Transaktivierungsfähigkeit. Der Test der unterschiedlichen Insertionen, die mit den verschiedenen Konstrukten hergestellt wurden, auf deren Fähigkeit zur Transaktivierung erfolgte durch Kreuzung der entsprechenden Aktivatoren gegen einen UAS-mycNIC Effektor und Myc-Antikörperfärbungen an Embryonen verschiedener Stadien.

Wie die Tabelle 3.3 zeigt, sind von den 22 insgesamt getesteten Insertionen mit Aktivatoronstrukten 15 in der Lage, die Expression eines Effektorgens unter der Kontrolle von UAS-Sequenzen nachweisbar zu transaktivieren, während das für 7 Insertionen nicht der Fall ist. Somit besitzen 68 % der potentiellen Aktivatoren tatsächlich die Fähigkeit zur Transaktivierung. Zieht man weiterhin in Betracht, dass die Insertionen 6, 23 und 92 mit dem *cmvtk*-Promotor und die Insertion 16 mit dem *svtk*-Promotor nur sehr wenig oder gar keine *gal4*-RNA exprimieren, so beträgt die Frequenz der zur Transaktivierung fähigen Aktivatoren mit stärkerer *gal4*-RNA Expression sogar 83 % der getesteten Insertionen. Bei den Insertionen 90 mit dem Carp  $\beta$ -actin-Promotor, 3 mit dem *Xef1<sub>-</sub>*-Promotor und 78 mit dem *deltaD*-Promotor ist zu erwarten, dass die inserierten DNA-Fragmente für kein funktionelles Gal4-Protein kodieren, da sie deutlich stärker *gal4*-RNA exprimieren als andere Insertionen, die zur Transaktivierung in der Lage sind.

Die in der Tabelle aufgelisteten Ergebnisse sind in den Abb. 3.2A-H dokumentiert. Bei Kreuzungen von UAS-mycNIC Effektoren gegen Aktivatoren mit dem *svtk*-, Carp  $\beta$ -actin-, *Xef1<sub>-</sub>*- und *hsp70*-Promotor spiegelt die Expression der Myc-Epitope weitgehend die *gal4*-RNA Expression der Aktivatoren wieder (vgl. Abb. 3.2A-H mit Abb. 3.1E,H,J,L-N,P,Q). Bei Kreuzungen gegen die verschiedenen *deltaD*-Aktivatoren ist das hingegen nur zum Teil der Fall. Während die Myc-Expression in den neurogenen Regionen des Embryos der Verteilung des *gal4*-Transkriptes weitestgehend entspricht (siehe aber auch Kapitel 3.7.3), ist eine Transaktivierung in der Schwanzknospe, im präsomitischen und im somitischen Mesoderm kaum nachzuweisen, obwohl im Aktivator *gal4*-RNA in diesen Geweben transkribiert wird (vgl. Abb. 3.2F,G mit Abb. 3.1P,Q). Ein möglicher Grund für diesen Sachverhalt könnte in der Dynamik der Gal4-Expression in diesen Geweben liegen. So ist die *gal4*-RNA Expression



in vielen anderen Geweben der unterschiedlichen Aktivatoren über einen längeren Entwicklungszeitraum offensichtlich relativ stabil. Bei der Expression verschiedener Mitglieder des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges in präsomitischen und somitischen Zellen ist allerdings eine größere Dynamik zu beobachten. Es ist also denkbar, dass eine möglicherweise zur Transaktivierung erforderliche Persistenz der Gal4-Expression in diesen Zellen nicht gegeben ist. Eine denkbare negative Regulation in diesen Zellen durch inhibierende Einflüsse von aktiviertem Notch auf die Expression des *deltaD*-Promotors scheint als alleinige Ursache unwahrscheinlich, da auch die Gfp-Expression bei Embryonen aus Kreuzungen der *deltaD*-GAL4 Aktivatoren mit einem UAS-gfp Effektor in den Zellen der Schwanzknospe, dem präsomitischen und dem somitischen Mesoderm sehr schwach ist (Kapitel 3.6).



**Abb. 3.2 (vorangegangene Seite):** Myc-Antikörperfärbungen an Embryonen aus Kreuzungen eines UAS-mycNIC Effektors mit verschiedenen Aktivatoren. (A,B) Embryonen aus Kreuzungen gegen den svtk-GAL4 Aktivator mit der Insertion Nr.73. (A) 1 Somiten-Stadium. Vgl. mit Abb. 3.1E. (B) 20 Stunden. Vgl. mit Abb. 3.1H. (C) Embryo im 14 Somiten-Stadium aus einer Kreuzung gegen den carp  $\beta$ -actin-GAL4 Aktivator mit der Insertion Nr.95. Vgl. mit Abb. 3.1J. (D) 20 Stunden alter Embryo aus einer Kreuzung gegen den Xef1\_-GAL4 Aktivator mit der Insertion Nr.10. Vgl. mit Abb. 3.1L. (E) 24 Stunden alter Embryo aus einer Kreuzung gegen den Xef1\_-GAL4 Aktivator mit der Insertion Nr.110. Vgl. mit Abb. 3.1M. (F,G) Embryonen bei 5 bzw. 14 Somiten aus einer Kreuzung gegen den deltaD-GAL4 Aktivator mit der Insertion Nr.58. Vgl. mit Abb. 3.1P,Q. (H) Bei 16 Somiten hitzegeschockter und bei 19 Somiten fixierter Embryo aus einer Kreuzung gegen den hsp-GAL4 Aktivator mit der Insertion Nr.13. Vgl. mit Abb. 3.1N.

### 3.6 Test der Effektoren auf Transaktivierbarkeit

Die meisten Effektoren wurden durch Kreuzung gegen mehrere Aktivatoren auf Transaktivierbarkeit getestet. Als Nachweiskriterium wurde eine dem jeweiligen Effektororgan angemessene Methode gewählt. In den meisten Fällen wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer Probe für das jeweilige Effektororgan an Embryonen aus Kreuzungen eines Aktivators mit dem entsprechenden Effektor durchgeführt. Dies erwies sich neben der Myc-Antikörperfärbung als sensitivste Methode, um die Transaktivierung des Effektorgens nachzuweisen. Die Expression der Reportergene *lacZ* und *gfp* wurde desweiteren durch X-gal-Färbungen bzw. Fluoreszenzbeobachtungen überprüft.

Für die unterschiedlichen Effektoren wurden folgende Beobachtungen gemacht:

- UAS-mycNIC: Alle vier getesteten Insertionen (5,19,34,73) dieses Konstruktes sind transaktivierbar. Bei Kreuzung dieser Effektoren gegen einen deltaD-GAL4 Aktivator (Insertion Nr.58) ließ sich bei den Nachkommen aus allen Kreuzungen das Myc-Epitop mittels einer Antikörperfärbung nachweisen (siehe auch Kapitel 3.5). Bis auf die im vorherigen Kapitel beschriebene Abwesenheit von Myc-Epitopen in der Schwanzknospe, im präsomitischen und somitischen Mesoderm spiegelte die Verteilung des Effektorproteins die *gal4*-RNA Expression des Aktivators wider. Auch bei Kreuzungen dieser Effektoren gegen andere Aktivatoren konnte in den meisten getesteten Fällen eine Transaktivierung nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 3.5).
- UAS-gfp: Von den 6 getesteten Insertionen (2,29,31,43,47,61) dieses Konstruktes konnte nur bei einer (Insertion Nr.61) eine eindeutige Transaktivierung nachgewiesen werden. Ursprünglich wurden alle diese Effektoren gegen einen hsp-GALAD1 Aktivator (Insertion Nr.2) gekreuzt, die Embryonen während der frühen Somitogenese hitzegeschockt und unter

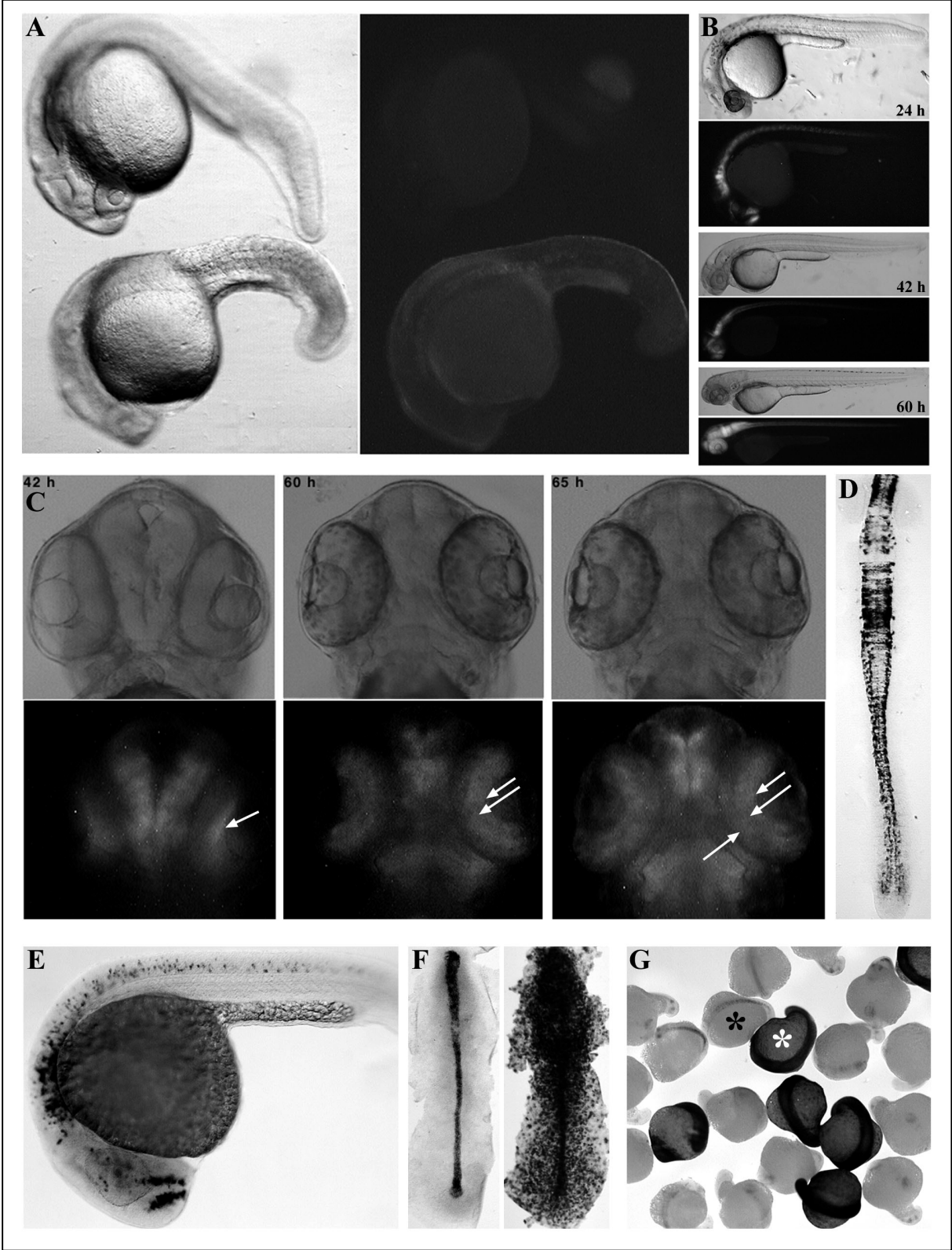
dem Fluoreszenzmikroskop in regelmäßigem Abstand auf Expression getestet. Nur bei der Insertion Nr.61 der so getesteten Effektoren war eine eindeutige Expression vier Stunden nach dem Hitzeschock zu erkennen (nicht gezeigt) und diese hatte sich 18 Stunden nach dem Hitzeschock noch verstärkt (Abb. 3.3A). Bei Kreuzungen der anderen UAS-gfp Effektoren mit dem hsp-GALAD1 Aktivator konnte auf diese Weise keine Gfp-Expression nachgewiesen werden. Bei einigen Nachkommen von Kreuzungen der UAS-gfp Effektoren (Insertionen Nr.29, 30, 31, 43 und 61) mit dem hsp-GALAD1 Aktivator wurden *gfp in situ* Hybridisierungen an hitzegeschockten Embryonen durchgeführt. Auch mit dieser Methode konnte nur bei der Insertion Nr.61 eine starke ubiquitäre Transaktivierung eindeutig nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In einigen Fällen (Insertionen Nr.29, 31 und 43) war ein sehr schwaches *in situ* Signal in bestimmten Geweben zu beobachten. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nur noch die Insertion Nr.61 weiter verwendet. Auf eine weiterführende Analyse der anderen Insertionen mit diesem Konstrukt wurde verzichtet.

Bei Kreuzungen transgener Organismen der Insertion Nr.61 mit anderen Aktivatoren (svtk-GAL4, hsp70-GAL4 und dID-GAL4) konnte ebenfalls Gfp-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Zwischen dem nachweisbaren Auftreten von *gal4*-Transkript im jeweiligen Aktivatorembryo und der Detektierbarkeit von Fluoreszenz verging allerdings in allen getesteten Fällen ein relativ langer Zeitraum. Bei Kreuzungen eines dID-GAL4 Aktivators (Insertion Nr.58) mit diesem UAS-gfp Effektor konnte eine eindeutige Fluoreszenz erst mit ca. 18 Stunden beobachtet werden, so dass mindestens 10 Stunden seit dem Einsetzen der *deltaD*-Expression vergangen waren. Die Gfp-Expression, die im Laufe der Zeit deutlich zunahm, wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop über die ersten drei Entwicklungstage weiterverfolgt (Abb. 3.3B,C). Sie war in Geweben zu beobachten, in denen *deltaD* in diesen Stadien nachzuweisen ist (z.B. Neuralrohr, Gehirn und Augen). Inwieweit die zu einem gegebenen Zeitpunkt beobachtete Fluoreszenz der *deltaD*-Expression des jeweiligen Stadiums entspricht oder ob sie, aufgrund der beschriebenen Verzögerung, in Wirklichkeit eine frühere Expressionskomponente widerspiegelt, kann mit den vorhandenen Daten nicht eindeutig bestimmt werden. *In situ* Hybridisierungen mit einer *gfp*-Probe an den entsprechenden Embryonen zeigten schon deutlich früher eine Expression (z.B. 2 Somiten), woraus geschlossen werden kann, dass die verzögerte Detektierbarkeit der Fluoreszenz nicht auf eine entsprechende Verzögerung der Transkriptionsaktivierung zurückzuführen ist, sondern durch die verspätete Nachweisbarkeit des Gfp-Proteins bedingt ist. Ähnlich wie schon für die Kreuzungen des dID-GAL4 Aktivators mit dem UAS-mycNIC Effektor beschrieben, war bei der Fluoreszenzbeobachtung der Embryonen aus Kreuzungen des dID-

GAL4 Aktivators mit dem UAS-gfp Effektor keine eindeutige Gfp-Expression in der Schwanzknospe, im präsomitischen Mesoderm oder in den Somiten nachweisbar, obwohl *gal4*-RNA in diesen Geweben des Aktivators exprimiert wird. Bei *in situ* Hybridisierungen mit einer *gfp*-Probe konnten allerdings, wenn auch nur sehr schwache, Signale in diesen Geweben beobachtet werden (Abb. 3.3D).

Bei Kreuzungen des hsp-GAL4 Aktivators (Insertion Nr.13) mit dem UAS-gfp Effektor (Insertion Nr.61) konnte, ähnlich wie bei den Experimenten mit dem hsp-GALAD1 Aktivator, vier Stunden nach dem Hitzeschock eine eindeutige Fluoreszenz beobachtet werden. Auch bei diesen Kreuzungen läßt sich die Fluoreszenz noch viele Stunden nach dem Hitzeschock nachweisen (nicht gezeigt). Dabei scheint Gfp zwar in allen Geweben exprimiert zu sein, aber die Stärke der Expression unterscheidet sich von Gewebe zu Gewebe. Besonders stark ist sie z.B. im Notochord, im Neuralrohr und in den Augen.

**Abb. 3.3 (folgende Seite):** Nachweis der Transaktivierbarkeit unterschiedlicher Effektoren. (A) Im 1 Somiten-Stadium hitzegeschockte und bei 26 Stunden fotografierte Embryonen aus Kreuzungen eines heterozygoten hsp-GALAD1 Aktivators (Insertion Nr.2) gegen einen heterozygoten UAS-gfp Effektor mit der Insertion Nr.61. Links: Durchlicht. Rechts: Fluoreszenz. Unten: mutmaßlich für das Aktivator- und Effektor-konstrukt transgener Embryo. (B,C) Embryonen aus Kreuzungen des UAS-gfp Effektors mit der Insertion Nr.61 gegen den deltaD-GAL4 Aktivator mit der Insertion Nr.58. Oben: jeweils Durchlicht. Unten: Fluoreszenz. Die Pfeile in (C) deuten die Ausbreitung der Fluoreszenz über die verschiedenen Schichten der Retina an. (D) *gfp in situ* Hybridisierung an einem 16 Stunden alten Embryo aus der gleichen Kreuzung. (E) *lacZ in situ* Hybridisierung an einem 24 Stunden alten Embryo aus einer Kreuzung des deltaD-GAL4 Aktivators (Insertion Nr.58) gegen einen UAS-lacZ Effektor mit der Insertion Nr.51. (F) *shh in situ* Hybridisierung an im Schwanzknospen-Stadium hitzegeschockten und bei 3 Somiten fixierten Embryonen aus Kreuzungen eines heterozygoten hsp-GAL4 Aktivators (Insertion Nr.13) gegen einen heterozygoten UAS-shh Effektor mit der Insertion Nr.7. Links: Embryo mit dem wildtypischen Expressionsmuster von *shh*. Rechts: mutmaßlich für das Aktivator- und Effektor-konstrukt transgener Embryo mit ubiquitärer *shh*-Expression. (G) *her4 in situ* Hybridisierung an mit 12 Somiten hitzegeschockten und bei 16 Somiten fixierten Embryonen aus Kreuzungen eines heterozygoten hsp-GAL4 Aktivators (Insertion Nr.13) gegen einen heterozygoten UAS-her4 Effektor mit der Insertion Nr.56. Der schwarze Stern markiert einen Embryo mit wildtypischen *her4*-Expressionsmuster, der weiße Stern einen mutmaßlich für das Aktivator- und Effektor-konstrukt transgenen Embryo mit ubiquitärer *her4*-Expression.



- UAS-lacZ: Alle vier UAS-lacZ-Insertionen wurden durch Kreuzung gegen einen dID-GAL4 Aktivator (Insertion Nr.58) und anschließende *lacZ in situ* Hybridisierung an Embryonen aus diesen Kreuzungen auf Transaktivierbarkeit getestet. Bei 24 Stunden alten Embryonen konnten bei zwei Insertionen (Nr.27 und Nr.51) *in situ* Signale nachgewiesen werden, deren Verteilung weitgehend den Komponenten des *deltaD*-Expressionsmusters entsprechen (Abb. 3.3E). Diese Signale waren bei Embryonen mit der Insertion Nr. 51 deutlich stärker als bei jenen mit der Insertion Nr. 27. Bei den Insertionen Nr.18 und Nr. 39 ist auf diese Weise keine Transaktivierung detektierbar. Bei keiner der vier Insertionen konnte an 24 Stunden alten Embryonen aus Kreuzungen gegen den dID-GAL4 Aktivator Nr.58 ein funktionelles  $\beta$ -Gal-Protein mit Hilfe einer X-gal-Färbung nachgewiesen werden. Da es sich bei den untersuchten UAS-lacZ Linien offensichtlich um keine besonders sensitiven Reporterstämme zum Nachweis von Gal4 handelt, wurde auf eine weitere Analyse dieser Insertionen verzichtet.
- UAS-sonic hedgehog: Bei allen fünf getesteten Insertionen (Nr. 8,36,47 und 63) konnte an hitzegeschockten Embryonen aus Kreuzungen gegen einen hsp-GAL4 Aktivator (Insertion Nr.13) eine Transaktivierung mit Hilfe einer *shh in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden. Hitzeschocks wurden zwischen 50 % Epibolie und 24 Stunden durchgeführt, und die Embryonen wurden 1 - 2 Stunden nach dem Hitzeschock fixiert. Da *shh* im Wildtyp nur in bestimmten Geweben exprimiert wird (z.B. im Notochord und in der Bodenplatte), konnte die Transaktivierung durch die ektopische, ubiquitäre *shh*-Expression in den für das Aktivator- und das Effektor-konstrukt transgenen Embryonen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 3.3F). Kontrollfärbungen mit nicht hitzegeschockten Embryonen aus diesen Kreuzungen zeigten keine ektopische Expression.
- UAS-her4: Wie für die *shh*-Effektoren, so wurde auch für die *her4*-Effektorenden Transaktivierbarkeit durch ektopische Expression der Effektor-RNA in hitzegeschockten Embryonen aus Kreuzungen des hsp-GAL4 Aktivators (Nr.13) mit den UAS-her4 transgenen Organismen nachgewiesen. Von den fünf getesteten Insertionen (Nr.2,13,36,56 und 61), konnte auf diese Weise bei zweien (Insertionen Nr.36 und 56) eine relativ starke Transaktivierung beobachtet werden (Abb. 3.3G), die bei der Insertion Nr.56 noch deutlich stärker war als bei der Insertion Nr.36. Bei der Insertion Nr. 2 wurde eine schwache Transaktivierung festgestellt, während für die Insertionen Nr. 13 und 61 keine ektopische Expression nachweisbar war.

Zusammengefasst ergab sich für die Tests der Transaktivierbarkeit der unterschiedlichen potentiellen Effektoren, dass für jedes Effektor-konstrukt Insertionen gefunden wurden, die in

Anwesenheit von Gal4 transaktiviert werden konnten. Allerdings schwankt der Anteil der transaktivierbaren Effektoren in Abhängigkeit von dem verwendeten Konstrukt und der angewandten Nachweismethode. Es ist zu betonen, dass die Einteilung in transaktivierbare und nicht transaktivierbare Insertionen insofern relativ willkürlich ist, als dass sie von der Nachweismethode abhängig ist. Wahrscheinlich sind alle denkbaren Abstufungen zwischen diesen Extremen möglich. Im vorliegenden Fall diene diese Einteilung der Bestimmung von denjenigen Insertionen, die für weitere Analysen geeignet sein würden.

Alle hier beschriebenen Ergebnisse sind in Tabelle 7.3 im Anhang zusammengefasst.

### **3.7 Funktionsanalysen unter Verwendung des GAL4-Systems**

In den folgenden Abschnitten werden die bisher mit dem GAL4-System vorgenommenen Funktionsanalysen vorgestellt. Als Effektoren wurden dabei Transgene mit Insertionen der Konstrukte UAS-mycNIC, UAS-her4 und UAS-sonic hedgehog verwendet. Als Aktivatoren dienten Transgene mit Insertionen der deltaD-GAL4 und hsp70-GAL4 Konstrukte.

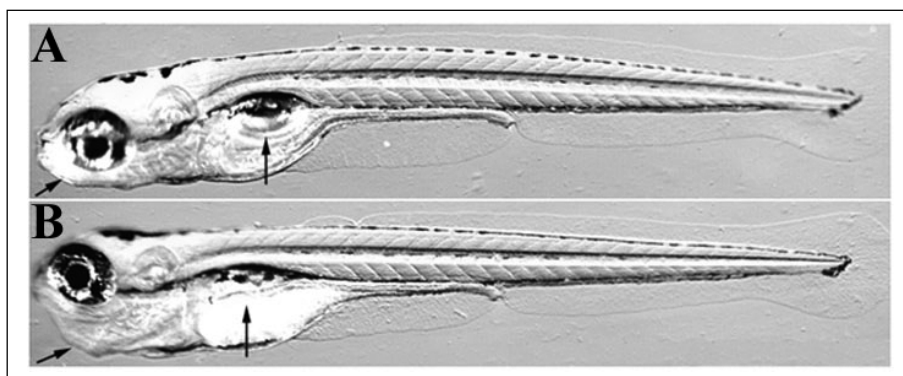
#### **3.7.1 Verwendete Linien bei der gezielten Expression von aktiviertem Notch**

Die ausführlichste Funktionsanalyse unter Verwendung des GAL4-Systems wurde bisher mit der UAS-mycNIC Insertion Nr.5 vorgenommen. Transgene Fische mit dieser Insertion werden im folgenden als NIC-Effektoren bezeichnet. Ergebnisse, die mit einer anderen Insertion dieses Konstrukt erzielt wurden, werden besonders gekennzeichnet. Als Aktivatoren wurden ausschließlich Transgene mit den Insertionen Nr.58 (deltaD-GAL4) und Nr.13 (hsp70-GAL4) verwendet, die im folgenden als dID-Aktivator und hsp-Aktivator bezeichnet werden.

Weiterhin werden die Nachkommen einer Kreuzung eines Aktivators mit einem Effektor, die einen eindeutig auf die Missexpression des Effektorgens zurückzuführenden Phänotyp aufweisen, im folgenden als Mutanten bezeichnet und dem Wildtyp gegenübergestellt.

### 3.7.2 Äußerliche Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch

dID-Aktivator x NIC-Effektor: Embryonen aus dieser Kreuzungen zeigen nur wenige morphologische Abnormalitäten. Allerdings lassen sich diese Embryonen schon mit 24 Stunden eindeutig von wildtypischen Embryonen unterscheiden, da sie fast keine Körperbewegungen vollziehen und kaum auf Berührung reagieren. Nach mechanischer Dechorionisierung sinken die Embryonen beispielsweise bewegungslos auf den Boden, während wildtypische Embryonen an heftigen Schwanzschlägen zu erkennen sind. Ein von Ablage zu Ablage unterschiedlicher Anteil an Mutanten verbleibt bis zum Tode im Chorion und auch geschlüpfte Larven sind nicht in der Lage, sich von der Stelle zu bewegen. Beim Vergleich fünf Tage alter Mutanten mit dem Wildtyp fällt auf, dass sich keine luftgefüllte Schwimmblase gebildet hat und das die Morphologie im Kieferbereich nicht weiter untersuchte Unregelmäßigkeiten aufweist (Abb. 3.4A,B). Die Mutanten sterben zwischen dem 7. und 10.Tag nach der Befruchtung. Die Stärke der beschriebenen Phänotypen ist bei unterschiedlichen Kreuzungen und in Abhängigkeit von den Aufzuchtbedingungen etwas unterschiedlich. Um sicherzustellen, dass der beobachtete Phänotyp tatsächlich auf die Aktivierung des Effektorgens zurückzuführen ist, wurden mutante und wildtypische Embryonen aus Kreuzungen unterschiedlicher heterozygoter Eltern einer PCR-Analyse unterzogen. Alle (16 von 16) als mutant klassifizierte Embryonen trugen das Aktivator- und das Effektor-konstrukt, während wildtypische Embryonen (20 von 20) positiv für das eine, das andere oder gar kein Konstrukt waren.

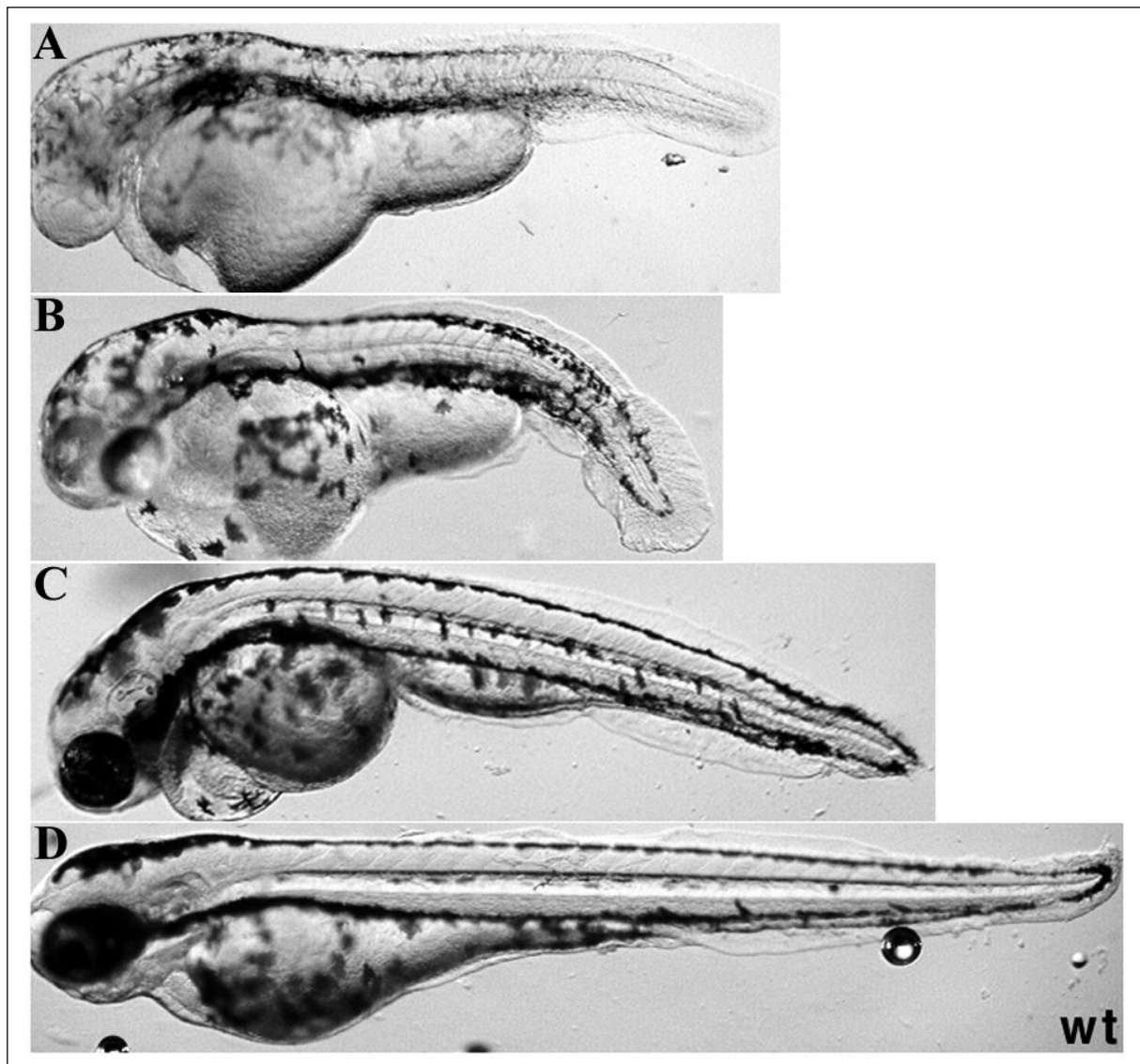


**Abb. 3.4:** Äußerliche Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch unter der Kontrolle des *deltaD*-Promotors. (A,B) Fünf Tage alte Nachkommen aus einer Kreuzung eines heterozygoten *dID*-Aktivators mit einem heterozygoten NIC-Effektor. (A) Äußerlich wildtypische Larve. (B) Mutante Larve. Die Pfeile markieren die Unterschiede im Kieferbereich und in der Schwimmblase bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp.



Kreuzungen des dID-Aktivators gegen Transgene mit anderen Insertionen des UAS-mycNIC Konstruktes führte zu Embryonen mit vergleichbaren, wenn auch deutlich milderen Phänotypen. In manchen Fällen waren die Mutanten in der Lage, sich zu bewegen, allerdings wirkten diese Bewegungen unkoordinierter als beim Wildtyp. Bezüglich der Stärke der phänotypischen Ausprägung der beschriebenen Merkmale bei Kreuzung gegen den dID-Aktivator ließ sich folgende Abstufung der UAS-mycNIC Insertionen feststellen: Nr.73 < 19 < 34 < 5.

hsp-Aktivator x NIC-Effektor: Im Gegensatz zu den beschriebenen Kreuzungen des dID-Aktivators mit dem NIC-Effektor haben Kreuzungen dieses Effektors mit dem hsp-Aktivator je nach Zeitpunkt und Dauer des Hitzeschocks starke morphologische Abnormalitäten zur Folge. Die frühesten Hitzeschocks wurden bei 50% Epibolie durchgeführt. Untersuchungen dieser Embryonen bei 24 Stunden zeigten, dass sich beispielsweise keine Augen gebildet hatten, die Somiten eine abnorme Form besaßen, das Notochord deutlich kleiner als in wildtypischen Embryonen war und die Embryonen in ihrer anterior-posterioren Ausdehnung gestaucht waren (Abb. 3.5A). Zu einem so frühen Entwicklungszeitpunkt hitzegeschockte Embryonen überlebten in aller Regel die ersten drei Tage der Entwicklung nicht. PCR-Analysen zeigten, dass alle Embryonen (13 von 13) mit dem beschriebenen Phänotyp das Aktivator- und Effektor-konstrukt trugen, während wildtypische Embryonen (15 von 15) aus Kreuzungen zweier heterozygoter Eltern entweder für das eine, das andere oder gar kein Konstrukt positiv waren. Hitzeschocks zu späteren Zeitpunkten (Schwanzknospenstadium und 10 Somiten) hatten ähnliche phänotypische Auswirkungen zur Folge, allerdings hatten zunehmend größere Teile des Rumpfes eine mehr dem Wildtyp gleichende Morphologie (Abb. 3.5B). Zwischen 24 und 48 Stunden hitzegeschockte Embryonen ließen sich ca. 24 Stunden nach dem Hitzeschock eindeutig als mutant erkennen, da sich ein Ödem im Herzsack bildete, das im Laufe der Zeit weiter anschwell (Abb. 3.5C). Außerdem sind die Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp deutlich kürzer in ihrer anterior-posterioren Ausdehnung. Auch dieser Effekt wird mit zunehmender Zeit immer deutlicher. Die zu diesen Zeiten hitzegeschockten Embryonen sterben in aller Regel nach dem fünften Entwicklungstag. Mit 72 Stunden hitzegeschockte Organismen, lassen sich mit sechs Tagen nach der Befruchtung durch die Bildung eines Ödems im Herzsack und aufgrund ihrer abnormen Bewegungen im Vergleich zum Wildtyp eindeutig als mutant klassifizieren.

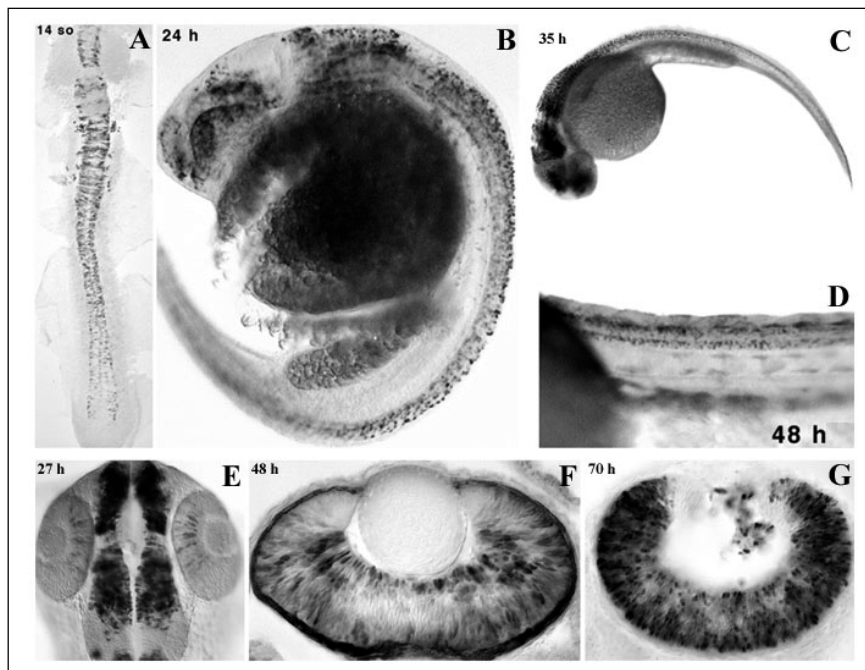


**Abb. 3.5:** Äußerliche Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch unter der Kontrolle des *hsp70*-Promotors. (A-D) Zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten hitzegeschockte 48 Stunden alte Embryonen aus Kreuzungen eines heterozygoten *hsp*-Aktivators gegen einen heterozygoten NIC-Effektor. (A) Bei 50 % Epibolie hitzegeschockter mutanter Embryo. (B) Im Schwanzknospen-Stadium hitzegeschockter mutanter Embryo. (C) Mit 24 Stunden hitzegeschockter mutanter Embryo. (D) Bei 50 % Epibolie hitzegeschockter wildtypischer Embryo.

### 3.7.3 Genauere Analyse der Expression des Effektorgens in Kreuzungen des NIC-Effektors mit dem *dlD*- und *hsp*-Aktivator

Um eine bessere Vorstellung von der Ursache der erzeugten Phänotypen zu bekommen, wurde die Expression des Effektorgens in Kreuzungen des NIC-Effektors mit dem *dlD*- und *hsp*-Aktivator genauer untersucht. Dies erfolgte durch Myc-Antikörperfärbungen an Embryonen dieser Kreuzungen.

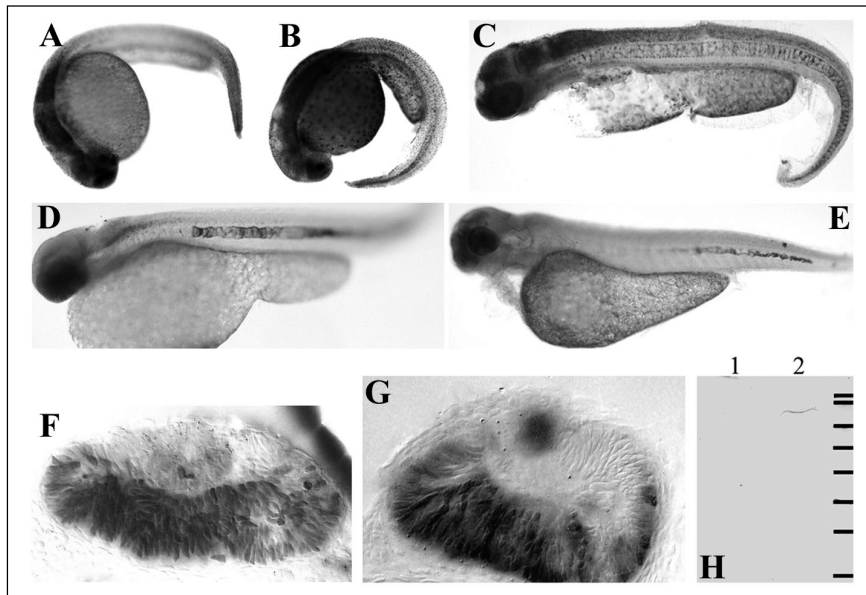
dID-Aktivator x NIC-Effektor: Die Expression der Myc-Epitope wird ungefähr im Schwanzknospen-Stadium sichtbar. Allerdings lassen sich in der Neuralplatte die Epitope im Gegensatz zur endogenen *deltaD*-Expression, die in breiten Streifen auftritt, nur in vereinzelt Zellen nachweisen (Abb. 3.2F). Mit anhaltender Entwicklungsdauer wird das Expressionsmuster, wie auch die endogene *deltaD*-Expression, zunehmend komplexer. In allen betrachteten Stadien bis zu 48 Stunden nach der Befruchtung exprimiert eine Vielzahl von Zellen im Rückenmark und im Gehirn die Epitope (Abb. 3.6A-D). Die Expression der Myc-Epitope in der Retina wurde ebenfalls analysiert, da auch die Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch in diesem Organ untersucht wurde. Bei 27 Stunden exprimieren nur einige vereinzelte Zellen die Epitope (Abb. 3.6E). Wie schon für die Neuralplatte beschrieben, steht dies im Widerspruch zur endogenen *deltaD*-Expression, die in diesem Stadium in der gesamten Retina auftritt. Bei 48 Stunden exprimieren eine ganze Reihe von Zellen die Epitope, wobei die Antigenizität in der entstehenden Ganglionzellschicht am stärksten ist (Abb. 3.6F). Mit 70 Stunden sind die meisten Epitope hingegen in der entstehenden Photorezeptorzellschicht nachzuweisen (Abb. 3.6G). Diese beobachtete Dynamik in der Expression der Myc-Epitope in der Retina ist vergleichbar mit der Gfp-Expression von Embryonen aus Kreuzungen des dID-Aktivators mit dem gfp-Effektor (vgl. Abb. 3.6F,G mit Abb. 3.3C).



**Abb. 3.6:** Myc-Antikörperfärbungen an Embryonen aus Kreuzungen des dID-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A) 14 Somiten. (B) 24 Stunden. (C) 35 Stunden. (D) 48 Stunden. (E) 27 Stunden. (F) 48 Stunden. (G) 70 Stunden.

hsp-Aktivator x NIC-Effektor: Bei diesen Kreuzungen war der Zeitverlauf der Expression des Effektorgens nach einem Hitzeschock von besonderem Interesse. Um eine Vorstellung davon zu bekommen ab wann und wie lange nach dem Hitzeschock das Effektorprotein vorhanden ist, wurden Hitzeschocks an verschiedenen Stadien durchgeführt und die Embryonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten danach fixiert. Bei Embryonen, die im Schwanzknospen-Stadium hitzegeschockt und 1, 2 oder 10 Stunden danach fixiert wurden, konnten die Myc-Epitope im ganzen Embryo nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Offensichtlich setzt die Expression des Effektorproteins unmittelbar nach dem Hitzeschock ein und hält für viele Stunden an. Da die Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch auf Zellschicksalsentscheidungen in der Retina in dieser Arbeit untersucht wurde, ist der zeitliche Verlauf der Expression des Effektorproteins in diesem Organ von Interesse. Dabei wurde festgestellt, dass bei Embryonen, die mit 24 Stunden hitzegeschockt wurden, 2, 10, 24, 30 oder 48 Stunden danach immer noch Myc-Epitope in den meisten Zellen der Retina nachweisbar sind (Abb. 3.7A-G). Offensichtlich bleibt im Laufe der Zeit die Expression nicht in allen Geweben gleichermaßen erhalten. Während 24 Stunden nach dem Hitzeschock noch eine starke Expression im Notochord, im Neuralrohr und in der Retina zu beobachten ist, lassen sich die Epitope in anderen Geweben, wie z.B. in den Somiten kaum noch nachweisen (Abb. 3.7C). 48 Stunden nach dem Hitzeschock beschränkt sich die Expression des Effektorproteins ausschließlich auf Zellen des Notochords und der Retina (Abb. 3.7E).

Um sicherzustellen, dass die noch viele Stunden nach dem Hitzeschock zu beobachtende Expression der Myc-Epitope tatsächlich ein funktionelles Effektorprotein und kein fragmentiertes Peptid repräsentieren, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurden Embryonen aus der Kreuzung des hsp-Aktivators mit dem NIC-Effektor mit 24 Stunden hitzegeschockt und bei 48 Stunden wurde eine Proteinextraktion aus wildtypischen und mutanten Embryonen vorgenommen. Die Proteinextrakte wurden einer Western Blot-Analyse unterzogen und mit Hilfe des Myc-Antikörpers wurde das Effektorprotein detektiert (Abb. 3.7H). Der Vergleich mit dem Größenstandard zeigt, dass das von dem Myc-Antikörper erkannte Protein eine Größe von ca. 91 kDa besitzt, was der erwarteten Größe des Myc-Notch:intra Proteins sehr genau entspricht. Offensichtlich ist dieses Protein also über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden nach dem Hitzeschock in den Zellen vorhanden und keiner Fragmentierung unterlegen.



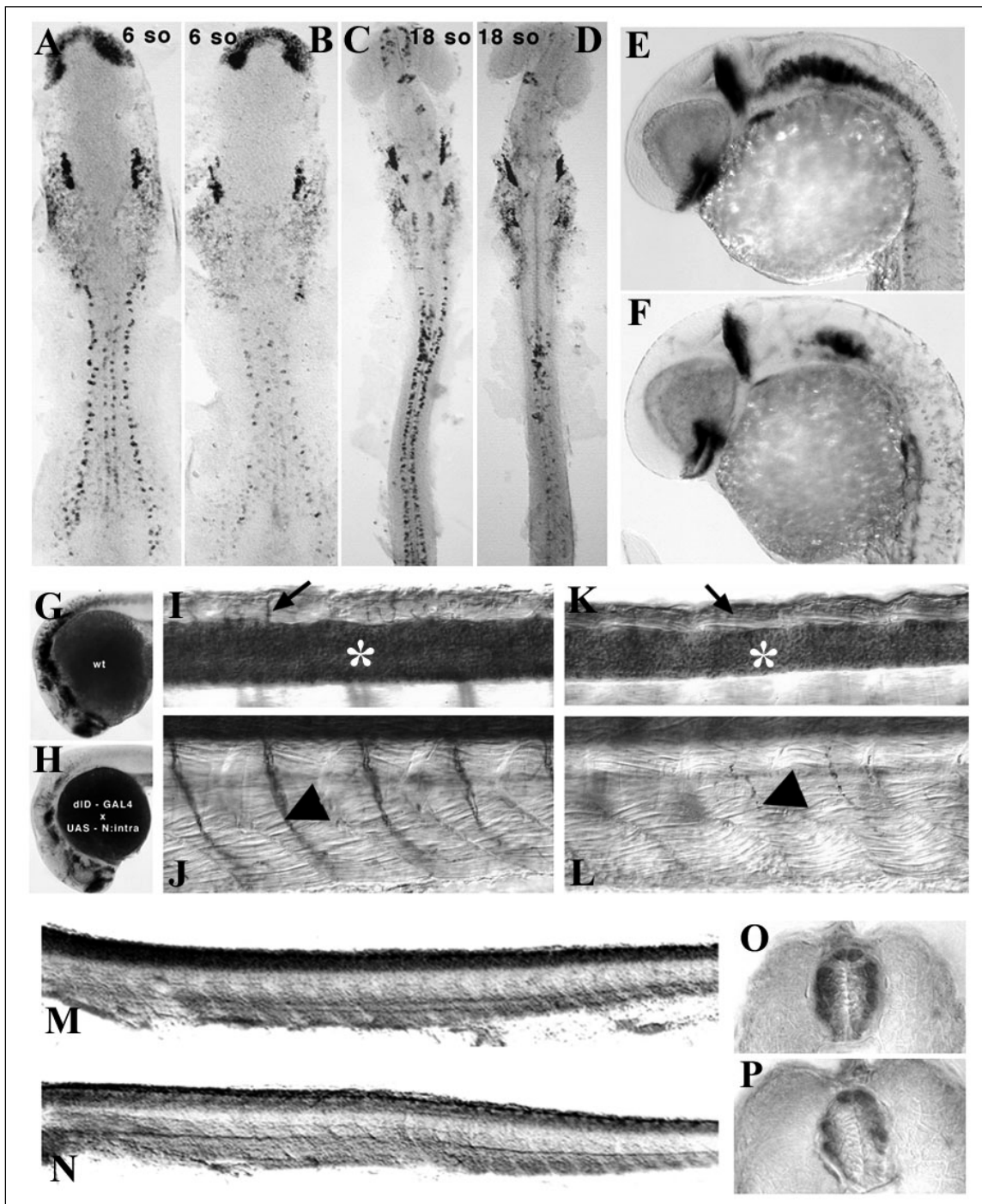
**Abb. 3.7:** Persistenz des Effektorproteins nach dem Hitzeschock von Embryonen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A-G) Myc-Antikörperfärbungen an mit 24 Stunden hitzegeschockten Embryonen (A) Fixiert mit 25 Stunden. (B) 34 Stunden. (C) 48 Stunden. (D) 54 Stunden. (E) 72 Stunden. (F) 54 Stunden. (G) 72 Stunden. (H) Western Blot eines Proteinextraktes 48 Stunden alter Embryonen, die mit 24 Stunden hitzegeschockt wurden. Zur Detektion des Effektorproteins wurde der Myc-Antikörper verwendet. Spur1: Proteinextrakt aus 15 wildtypischen Embryonen. Spur2: Proteinextrakt aus 15 mutanten Embryonen. Rechte Spur: Die schwarzen Balken zeigen die Banden des *SeeBlue™ Plus2*-Markers der Firma Novex. Der Vergleich mit diesem Größenstandard zeigt, dass das von dem Myc-Antikörper erkannte Protein in Spur2 eine Größe von ca. 91 kDa besitzt.

### 3.7.4 Die Expression von aktiviertem Notch in der Neuralplatte und im Neuralrohr führt zur Unterdrückung der Expression neuronaler Marker

Um zu überprüfen, welche Auswirkung die Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des GAL4-Systems auf Zellschicksalsentscheidungen im Neuralrohr hat, wurden Analysen mit mehreren Markern durchgeführt. Falls diese Untersuchungen an Stadien durchgeführt wurden, zu denen sich mutante und wildtypische Embryonen noch nicht eindeutig voneinander unterscheiden lassen (bis 18 Somiten), wurde bei einem Teil der Embryonen die *in situ* Hybridisierung für den jeweiligen Marker mit einer Myc-Antikörperfärbung gekoppelt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass der beobachtete Phänotyp nur solche Embryonen betrifft, in denen aktiviertes Notch exprimiert wird. Alle hier beschriebenen Ergebnisse an jüngeren Stadien wurden auf diese Weise abgesichert. Bei den gezeigten Abbildungen wurden allerdings Objekte verwendet, bei denen keine zusätzliche Myc-Antikörperfärbung durchgeführt wurde, damit die Effekte besser zu erkennen sind.

### dID-Aktivator x NIC-Effektor:

- *islet1*: Embryonen wurden im 6 und 18 Somiten-Stadium und bei 33 Stunden nach der Befruchtung fixiert und mit einer *in situ* Hybridisierung wurde die Expression des Markers *islet1* überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass es zu jedem getesteten Entwicklungszeitpunkt deutlich weniger *islet1*-positive Zellen in der Neuralplatte bzw. im Neuralrohr der Mutanten gibt, als im Wildtyp (Abb. 3.8A-D). Dabei sind die prospektiven Motorneurone und sensorischen Neurone gleichermaßen betroffen. Die Expression des Markers in anderen Geweben des Embryos (zB. im Trigeminalganglion und im Kopfpolster) bleibt unverändert und auch im Neuralrohr ist die Unterdrückung von *islet1*-positiven Zellen offensichtlich nicht vollständig.
- *pax2*: Die Expression dieses Markers wurde bei 24 Stunden nach der Befruchtung untersucht. *pax2* färbt unter anderem bestimmte, identifizierte Interneurone im Hinterhirn und im Neuralrohr (Mikkola et al., 1992). Während diese *pax2*-positiven Interneurone in den Mutanten deutlich reduziert sind, bleibt die Expression in anderen Expressionsdomänen (z. der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze, dem optischen Stiel und in den Ohrplakoden) unverändert (Abb. 3.8E,F).
- *elav/HuC*: Dieser Marker wurde als früherer Marker für die neuronale Determination einer Zelle beschrieben (Kim et al., 1996). Mutante Embryonen zeigen mit 24 Stunden generell weniger *elav/HuC*-positive Zellen als der Wildtyp (Abb. 3.8G,H).
- $\beta$ -acetyliertes Tubulin: Um Informationen über das Vorkommen neuronaler Zellen in älteren Stadien mutanter Organismen zu bekommen, wurde ein Antikörper gegen acetyliertes Tubulin verwendet, das verstärkt in projizierenden Axonen exprimiert ist (siehe Chitnis und Kuwada, 1990). Bei drei Tage alten Mutanten beobachtet man deutlich weniger Axone als im Wildtyp (Abb. 3.8I-L). Dabei sind offenbar wieder eine ganze Reihe unterschiedlicher Zelltypen betroffen. Sowohl die Axone von Motorneuronen und sensorischen Neuronen wie auch die Axone anderer innerhalb des Neuralrohr projizierender Zellen sind reduziert.
- $\beta$ -Hu (16A11): Dieser Antikörper bindet spezifisch an ein in vielen neuronalen Zellen exprimiertes Epitop (Marusich et al., 1994). Bei 50 Stunden alten Mutanten ist eine starke Reduktion von 16A11-positiven Zellen im Rückenmark und Gehirn im Vergleich zum Wildtyp festzustellen (Abb. 3.8M-P).
- Andere Marker neuronaler Zellen: die beschriebene Reduktion neuronaler Zellen in mutanten Organismen wurde auch mit dem Antikörper  $\beta$ -III-tubulin ein Epitop in Axonen einer ganzen Reihe unterschiedlicher neuronaler Zellen erkennt (Trevarrow, 1990), und zB,

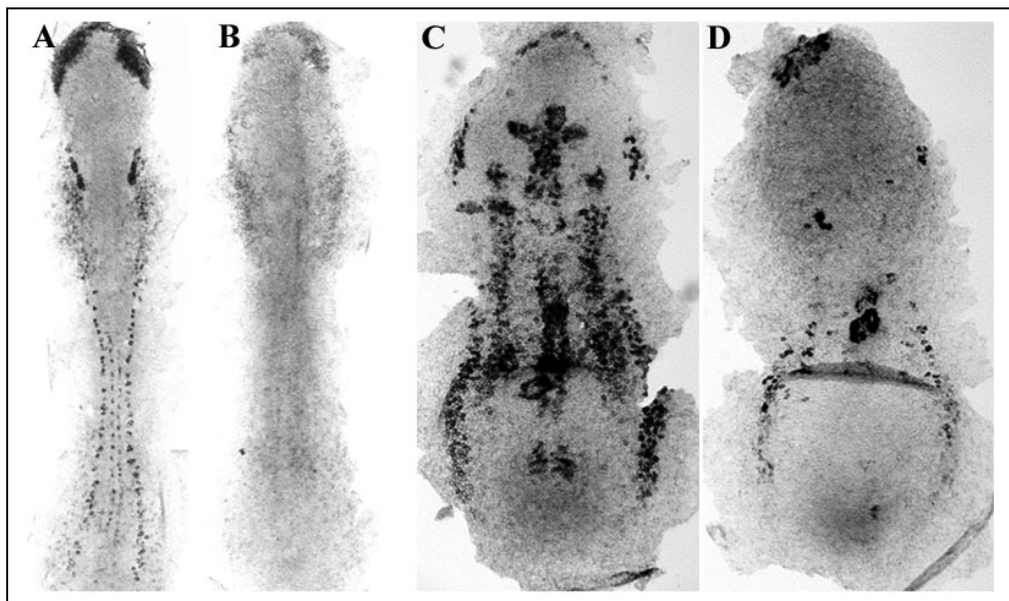


**Abb. 3.8:** Unterdrückung der Expression neuronaler Marker bei Embryonen aus Kreuzungen des *did*-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A-D) *islet1* *in situ* Hybridisierungen an 6 Somiten (A,B) bzw. 18 Somiten (C,D) alten Embryonen. (A,C) Wildtyp. (B,D) Mutant. (E,F) *pax2* *in situ* Hybridisierungen an 24 Stunden alten Embryonen. (E) Wildtyp. (F) Mutant. (G,H) *elav/HuC* *in situ* Hybridisierungen an 24 Stunden alten Embryonen. (G) Wildtyp. (H) Mutant. (I-L) acet.Tubulin-Antikörperfärbungen an drei Tage alten Wildtypen (I,J) bzw. Mutanten (K,L). Bei (I,K) sind das Neuralrohr (Sterne) und die sensorischen Neurone (Pfeile) im Fokus, bei (J,L) die Motorneurone (Pfeilspitzen). (M-P) 16A11-Antikörperfärbungen an 50 Stunden alten wildtypischen (M,O) bzw. mutanten (N,P) Embryonen. Die transversalen Schnitte in (O,P) gehen durch einen vergleichbaren Bereich entlang der anterior-posterioren Achse.

mit dem sich sekundäre Motorneurone detektieren lassen (Trevarrow et al., 1990), bei allen untersuchten Entwicklungsstadien beobachtet (nicht gezeigt).

hsp-Aktivator x NIC-Effektor:

- *islet1*: Embryonen aus dieser Kreuzung wurden bei 70 % Epibolie hitzegeschockt und im 8 Somiten-Stadium fixiert. *In situ* Hybridisierungen an diesen Embryonen zeigen eine nahezu vollständige Reduktion der Zahl *islet1*-positiver Zellen im gesamten Embryo (Abb. 3.9A,B). Der Effekt auf die *islet1*-positiven Zellen in der Gehirnanlage und in der Neuralplatte ist stärker als der bei Embryonen aus Kreuzungen des deltaD-Aktivators mit dem gleichen Effektor (vgl. Abb. 3.9B mit Abb. 3.8B).
- *neurogenin1(ngn1)*: *neurogenin1* ist ein Homolog des proneuraltranskriptionsfaktors *atonal* aus *Drosophila* (Blader et al., 1997). Wie durch mRNA-Injektionen gezeigt werden konnte wird dessen Expression durch die laterale Inhibition reguliert (Blader et al., 1997; Takke et al., 1999). Um zu überprüfen, ob die mit dem GAL4-System erzielten Ergebnisse mit denen der mRNA-Injektionen übereinstimmen, wurden Embryonen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit dem NIC-Effektor bei 70 % Epibolie hitzegeschockt und im 1 Somiten-Stadium fixiert. *In situ* Hybridisierungen an diesen Embryonen zeigen eine sehr starke Reduktion der Zahl *ngn1*-positiver Zellen im gesamten Embryo (Abb. 3.9C,D).



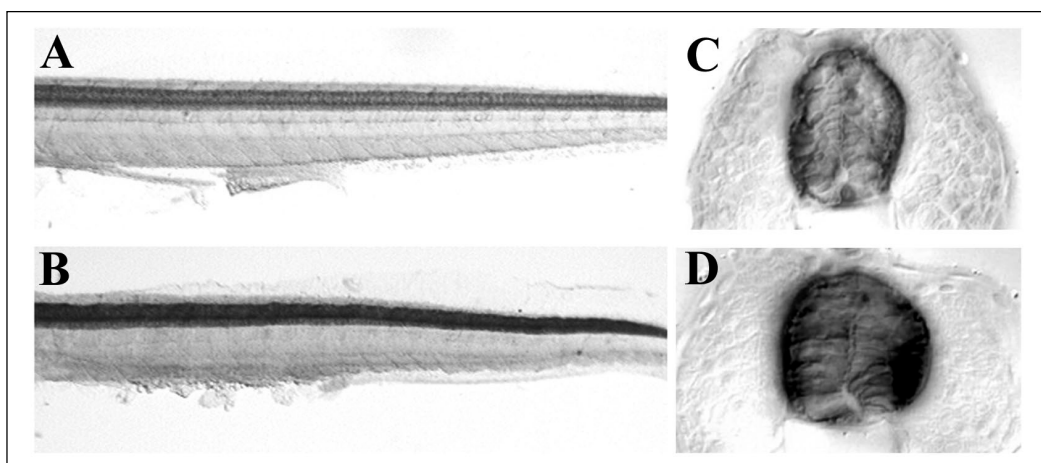
**Abb. 3.9:** Unterdrückung der Expression neuronaler Marker bei Embryonen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A,B) *islet1 in situ* Hybridisierungen an mit 70 % Epibolie hitzegeschockten und bei 8 Somiten fixierten Embryonen. (A) Wildtyp. (B) Mutant. (C,D) *ngn1 in situ* Hybridisierungen an mit 70 % Epibolie hitzegeschockten und im 1 Somiten-Stadium fixierten Embryonen. (C) Wildtyp. (D) Mutant.



Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von aktiviertem Notch mit allen getesteten Markern und zu jedem untersuchten Entwicklungsstadium zu einer Unterdrückung von neuronalem Zellschicksal in der Neuralplatte und im Neuralrohr führt.

### 3.7.5 Die Expression von aktiviertem Notch in der Neuralplatte und im Neuralrohr führt zu einer verstärkten Ausprägung von glialem Zellschicksal

Um die Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch auf die Ausprägung des Gliazellschicksals zu überprüfen, wurde von dem Antikörper *zrf1*, der ein spezifisch in den Fortsätzen radialer Gliazellen exprimiertes Epitop erkennt (Trevarrow et al., 1990), Gebrauch gemacht. Untersuchungen wurden bisher an Embryonen aus Kreuzungen des *dID*-Aktivators mit dem NIC-Effektor durchgeführt. Antikörperfärbungen an zwei und drei Tage alten mutanten Organismen zeigen eine stärkere Antigenizität im Rückenmark als Färbungen an entsprechenden Wildtypstadien (Abb. 3.10A-D). Da dieser Effekt relativ mild ist und um sicherzustellen, dass es sich hierbei nicht um eine zufallsgemäße Schwankung bei der Antikörperfärbung handelt, wurden die Färbungen mehrmals in unabhängigen Experimenten wiederholt. Das beschriebene Ergebnis war in allen diesen Experimenten reproduzierbar. Während die Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des *dID*-Aktivators also zu einer Unterdrückung von neuronalem Schicksal in der Neuralplatte und im Neuralrohr führt, wird die Ausprägung von glialem Schicksal nicht reprimiert. Offensichtlich entwickeln sich unter diesen Bedingungen sogar mehr Zellen als Gliazellen.



**Abb. 3.10:** Verstärkte Ausprägung von glialem Zellschicksal im Neuralrohr von 48 Stunden alten Embryonen aus Kreuzungen des *dID*-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A-D) *zrf1*-Antikörperfärbungen. (A,C) Wildtyp. (B,D) Mutante. Die transversalen Schnitte in (C,D) gehen durch vergleichbare Bereiche entlang der anterior-posterioren Achse.

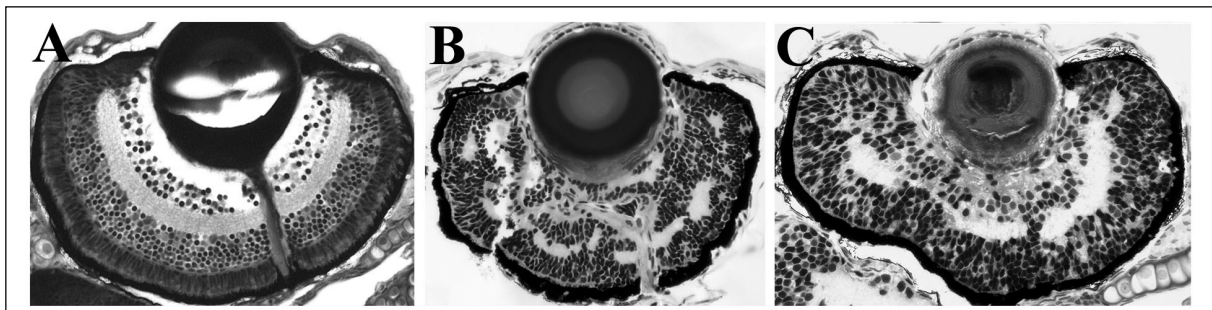
### 3.7.6 Die Expression von aktiviertem Notch in der Retina führt zu einer Disorganisation der retinalen Schichtung

Da die Zellen der Retina eine sehr regelmäßige Anordnung haben und in verschiedenen Schichten organisiert sind (siehe Kapitel 1.1.2) wurde mit Hilfe von Methyleneblau/Toluidinblau-Färbungen an Schnitten überprüft, ob die Expression von aktiviertem Notch einen Einfluß auf diese Strukturierung hat.

#### dID-Aktivator x NIC-Effektor:

Färbungen an Schnitten drei bzw. fünf Tage alter Organismen zeigen, dass die am Wildtyp zu beobachtende regelmäßige Schichtung der Retina in den Mutanten gestört ist (Abb. 3.11A,B). Dies wird besonders deutlich bei der Betrachtung der im Wildtyp zellkörperfreien plexiformen Schichten, die in der Mutante an vielen Stellen von Zellkörpern durchbrochen sind. Aber auch die zellulären Schichten sind in ihrer Strukturierung gestört. Während sich im Wildtyp viele unterschiedliche Zelltypen durch ihre Morphologie und regelmäßige Anordnung identifizieren lassen, ist die Identifikation dieser Zellen in der Mutante kaum möglich. So lassen sich beispielsweise die Photorezeptoren mit ihrer charakteristischen Morphologie und palisadenartigen Anordnung in der Mutante nicht erkennen.

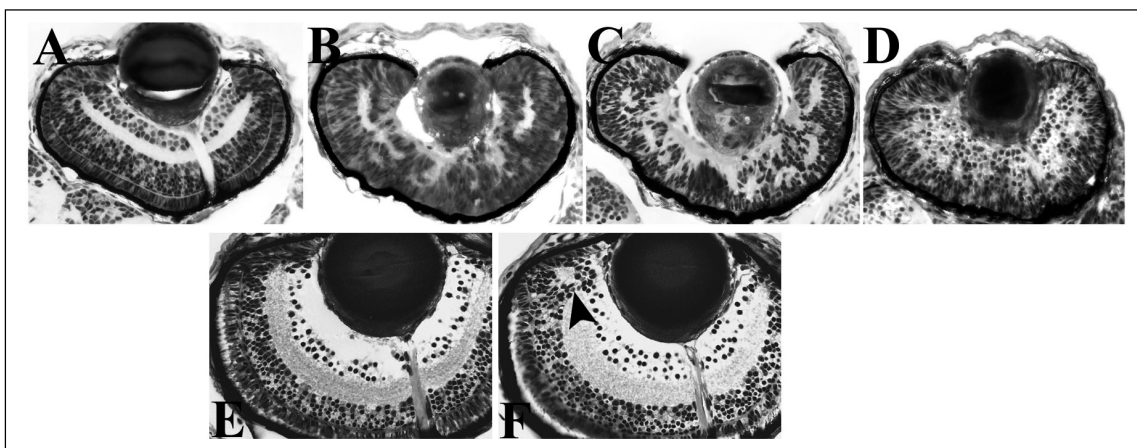
Auch bei Kreuzungen des dID-Aktivators gegen den UAS-NIC Effektor mit der Insertion Nr.34 ist eine Disorganisation der Schichtung der Retina zu beobachten, die allerdings, entsprechend dem allgemeinen Phänotyp, weniger stark ist als in Kreuzungen gegen den Effektor mit der Insertion Nr.5 (Abb. 3.11C).



**Abb. 3.11:** Störung der retinalen Schichtung bei 5 Tage alten Mutanten aus Kreuzungen des dID-Aktivators mit zwei verschiedenen Effektoren mit dem UAS-mycNIC Konstrukt. (A) Wildtyp. (B) Mutante aus einer Kreuzung des dID-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (C) Mutante aus einer Kreuzung des dID-Aktivators mit einem UAS-mycNIC-Effektor mit der Insertion Nr. 34. In allen Fällen handelt es sich um transversale Schnitte durch den zentralen Bereich eines Auges. Dorsal ist links.

### hsp-Aktivator x NIC-Effektor:

Die Embryonen wurden bei 27, 35 bzw. 48 Stunden nach der Befruchtung hitzegeschockt und mit drei Tagen fixiert. Die Färbungen zeigen, dass in allen Fällen die Strukturierung des Auges stark gestört ist (Abb. 3.12A-D). Sowohl bei mit 27 wie auch 35 Stunden hitzegeschockten Embryonen läßt sich im zentralen Bereich der Retina so gut wie keine Schichtung im Auge erkennen. Es sind keine plexiformen Schichten vorhanden, sondern die gesamte Retina ist von Zellen durchzogen. Bei mit 27 Stunden hitzegeschockten Embryonen ist der zentrale Bereich der Retina deutlich stärker betroffen als der periphere. Zur Marginalzone hin ist eine Strukturierung zu beobachten, die der Organisation im Wildtyp relativ ähnlich ist. Wurde der Hitzeschock mit 48 Stunden durchgeführt, so ist der innere Bereich der Retina vergleichsweise normal. Es lassen sich Zellen erkennen, die von ihrer Morphologie und Anordnung her an Ganglionzellen erinnern. Diese sind von weiter außen gelegenen Zellen der Retina durch eine, wenn auch schmale, zellkörperfreie Schicht getrennt. Eine ausdifferenzierte Photorezeptorzellschicht und eine zweite plexiforme Schicht lassen sich hingegen nicht erkennen. Bei mit 72 Stunden nach der Befruchtung hitzegeschockten und mit sechs Tagen fixierten Mutanten zeigt der zentrale Bereich der Retina eine wildtypische Strukturierung, während im dorsalen Bereich nahe der Marginalzone die normalerweise deutlich getrennten Ebenen von Zellen durchbrochen sind (Abb. 3.12E,F). Die Disorganisation betrifft scheinbar alle Schichten der Retina in diesem Bereich.



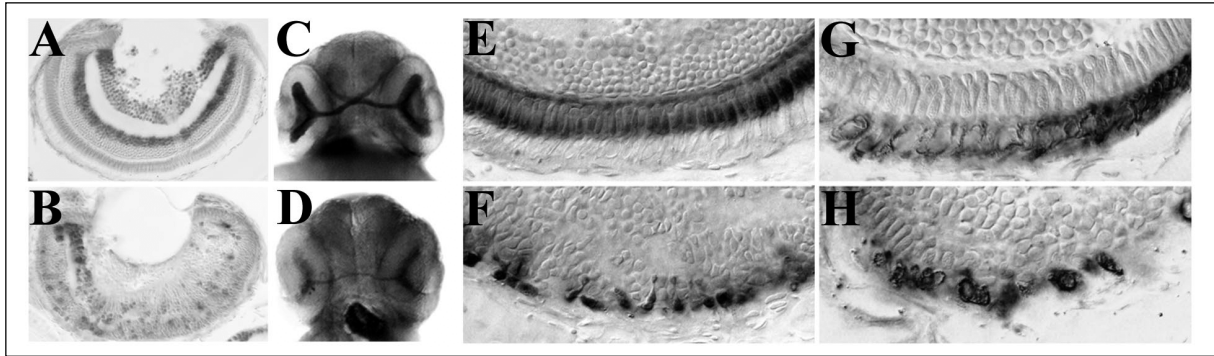
**Abb. 3.12:** Störung der retinalen Schichtung bei zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten hitzegeschockten Nachkommen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A-D) Transversale Schnitte durch den zentralen Bereich eines Auges drei Tage alter Organismen. Dorsal ist links. (A) Mit 27 Stunden hitzegeschockter Wildtyp. (B) Mit 27 Stunden hitzegeschockte Mutante. (C) Mit 35 Stunden hitzegeschockte Mutante. (D) Mit 48 Stunden hitzegeschockte Mutante. (E,F) Transversale Schnitte durch den zentralen Bereich eines Auges von mit drei Tagen hitzegeschockten und mit sechs Tagen fixierten Organismen. (E) Wildtyp. (F) Mutante. Die Pfeilspitze deutet auf die Disorganisation der Schichtung im dorsalen Bereich der Retina, nahe der marginalen Zone.

### 3.7.7 Die Expression von aktiviertem Notch in der Retina führt zu einer Unterdrückung von neuronalem Zellschicksal

Ähnlich wie für das Rückenmark wurden Analysen mit mehreren neuronalen Markern durchgeführt, um die Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch auf Zellschicksalsentscheidungen in der Retina zu untersuchen.

#### DL1-Aktivator x NIC-Effektor:

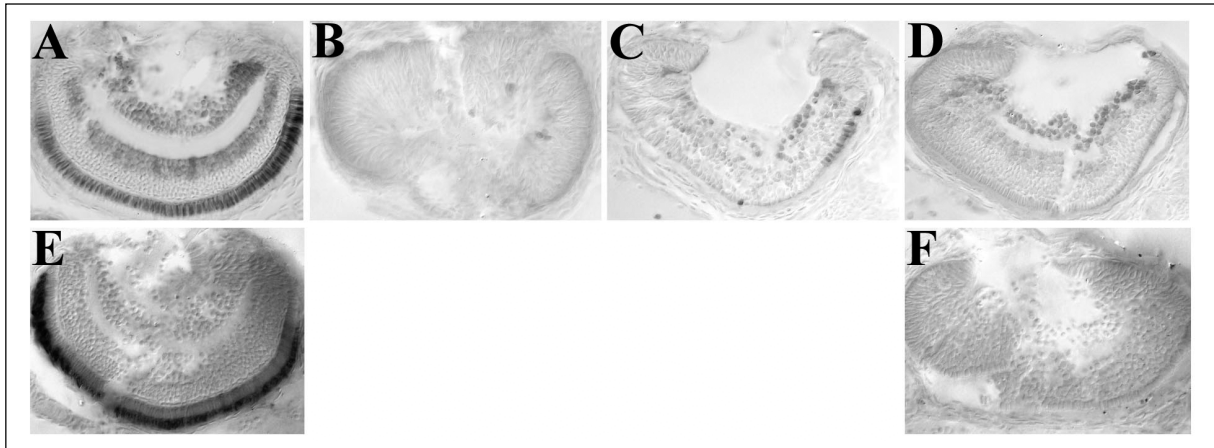
- DL1-Hu (16A11): Färbungen an drei bzw. fünf Tage alten Wildtypen zeigen, dass dieser Antikörper Ganglion- und Amakrinzellen der Retina markiert (Abb. 3.13A). 16A11-positive Zellen entsprechender Stadien mutanter Organismen sind deutlich reduziert und die Regelmäßigkeit in deren Anordnung ist gestört (Abb. 3.13B). Dabei fällt auf, dass im dorsalen peripheren Bereich der Retina mutanter Organismen die Organisation der 16A11-positiven Zellen weniger stark beeinträchtigt ist als im zentralen Bereich. Außerdem ist zu beobachten, dass es in der Mutante im Gegensatz zum Wildtyp keine unmittelbar am inneren Rand der Retina befindlichen 16A11-positiven Zellen gibt. Da dieser Bereich normalerweise ausschließlich von Ganglionzellen besiedelt ist, gibt es in der Mutante entweder keine Ganglionzellen, oder diese sind von anderen Zellen vom inneren Rand verdrängt.
- zn8: Dieser Antikörper bindet an ein Epitop, das unter anderem in den Axonen von Ganglionzellen exprimiert ist (Trevarrow et al., 1990). Färbungen an 48 Stunden alten Embryonen zeigen, daß mutante Organismen einen deutlich kleineren optischen Nerv besitzen als gleichaltrige Wildtypen (Abb. 3.13C,D).
- FRet43: Mit diesem Marker läßt sich ein bestimmter Typ von Zapfen (Doppelzapfen) in der Photorezeptorzellschicht der Retina färben (Larison und BreMiller, 1990). FRet43-positive Zellen in der Retina von drei bzw. fünf Tage alten Organismen sind in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert und die Regelmäßigkeit in deren Anordnung ist gestört (Abb. 3.13E,F). Außerdem besitzen die verbliebenden FRet43-positiven Zellen eine abnorme Morphologie, da die äußeren Segmente reduziert sind oder ganz fehlen.
- FRet11: Mit diesem Marker lassen sich die Stäbchen in der Photorezeptorschicht der Retina färben (Schmitt und Dowling, 1996). FRet11-positive Zellen in der Retina von drei bzw. fünf Tage alten Organismen sind in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert und die Regelmäßigkeit in deren Anordnung ist gestört (Abb. 3.13G,H).



**Abb. 3.13:** Unterdrückung von neuronalem Zellschicksal in der Retina von Nachkommen aus Kreuzungen des dlD-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A,B) 16A11-Antikörperfärbungen. Transversalschnitte durch Augen 5 Tage alter Organismen. (A) Wildtyp. (B) Mutante. (C,D) zn8-Antikörperfärbungen. Ventrale Ansichten auf die Köpfe 48 Stunden alter Embryonen. (C) Wildtyp. (D) Mutante. (E,F) FRet43-Antikörperfärbungen. Transversalschnitte durch Augen 5 Tage alter Organismen. (E) Wildtyp. (F) Mutante. (G,H) FRet11-Antikörperfärbungen. Transversalschnitte durch Augen 5 Tage alter Organismen. (G) Wildtyp. (H) Mutante.

hsp-Aktivator x NIC-Effektor:

- 16A11/FRet43: Da die 16A11-positiven Ganglion- und Amakrinzellen aufgrund ihrer Lage und Morphologie gut von den FRet43-positiven Doppelzapfen zu unterscheiden sind, wurden in diesem Fall Doppelfärbungen mit diesen beiden Markern durchgeführt. Bei 27 Stunden hitzegeschockten und mit drei Tagen fixierten Mutanten fehlen die 16A11- und FRet43-positiven Zellen komplett (Abb. 3.14B). Wurde der Hitzeschock bei 35 Stunden durchgeführt, so sind einige 16A11-positive Zellen vornehmlich im ventralen Bereich der Ganglionzellschicht zu beobachten (Abb. 3.14C). An dieser Stelle treten auch vereinzelte FRet43-positive Zellen in der Photorezeptorschicht auf. Bei 48 Stunden hitzegeschockten Organismen lassen sich 16A11-positive Zellen in der normalen Position von Ganglion- und Amakrinzellen detektieren. FRet43-positive Zellen sind nur wenige zu beobachten (Abb. 3.14D).
- FRet11: Bei mit 48 Stunden hitzegeschockten und mit drei Tagen fixierten Mutanten lassen sich kaum FRet11-positive Stäbchen detektieren (Abb. 3.14F).



**Abb. 3.14:** Unterdrückung von neuronalem Zellschicksal in der Retina von zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten hitzegeschockten Nachkommen aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A-D) 16A11/FRet43-Doppelfärbungen. Transversale Schnitte durch Augen drei Tage alter Organsimen. (A) Mit 27 Stunden hitzegeschockter Wildtyp. (B) Mit 27 Stunden hitzegeschockte Mutante. (C) Mit 35 Stunden hitzegeschockte Mutante. (D) Mit 48 Stunden hitzegeschockte Mutante. (E,F) FRet11-Färbungen. Transversale Schnitte durch Augen von mit 48 Stunden hitzegeschockten und mit drei Tagen fixierten Organsimen. (E) Wildtyp. (F) Mutante.

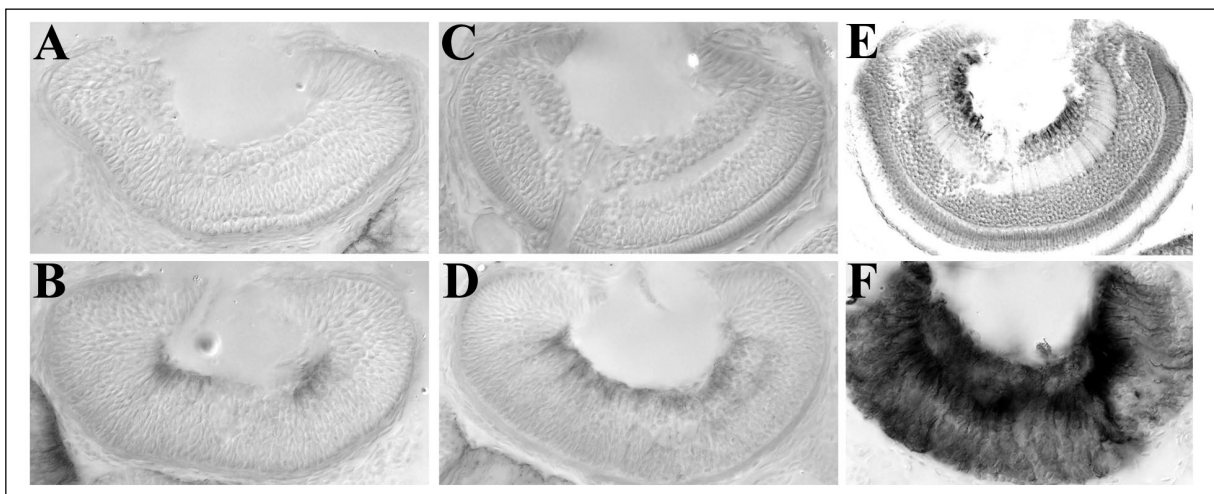
Die Expression von aktiviertem Notch sowohl unter Kontrolle des *deltaD*- wie auch des *hsp70*-Promotors führt also zu einer Reduktion verschiedener neuronaler Zelltypen in der Retina. Dies gilt für alle vier getesteten neuronalen Zelltypen (Ganglionzellen, Amakrinzellen, Stäbchen und Zapfen). Für die anderen beiden neuronalen Zelltypen der Retina (Bipolarzellen und Horizontalzellen) standen keine geeigneten Marker zur Verfügung.

### **3.7.8 Die Expression von aktiviertem Notch in der Retina führt zu einer verstärkten Ausprägung von glialem Zellschicksal**

Um zu testen, ob die Expression von aktiviertem Notch in der Retina, ähnlich wie im Neuralrohr, zu einer verstärkten Ausprägung von glialem Zellschicksal führt, wurden *zrf1*-Antikörperfärbungen durchgeführt.

wt: Im Wildtyp lassen sich *zrf1*-positive Zellen ab ca. vier Tagen nach der Befruchtung nachweisen. Die Fortsätze durchziehen die Retina, wobei die Antigenizität an den in der Ganglionzellschicht gelegenen Endfüßen am stärksten ist (Abb. 3.15A,C,E). Da für Fische, wie auch für andere Wirbeltiere, die Müllerschen Gliazellen als einziger glialer Zelltyp der Retina beschrieben sind und da diese Zellen auch mit ihren Fortsätzen die Retina durchziehen (Cajal, 1893), ist davon auszugehen, dass der *zrf1*-Antikörper die Fortsätze von Müllerschen Gliazellen färbt.

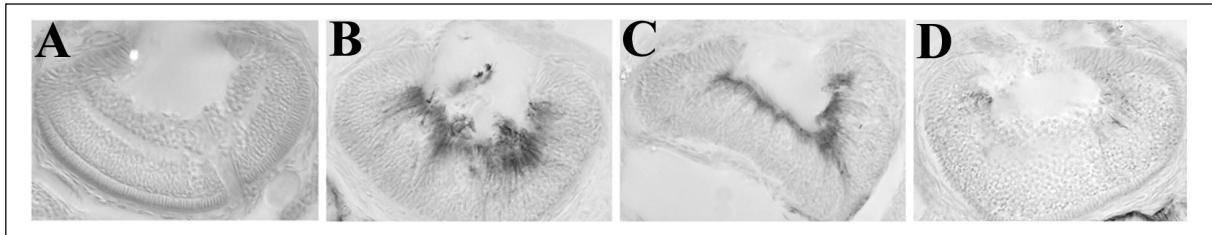
dID-Aktivator x NIC-Effektor: Färbungen an sechs Tage alten Organismen zeigen einen sehr starken Anstieg der Zahl der Fortsätze radialer Gliazellen in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.15F). Im Alter von zwei bzw. drei Tagen, in dem noch keine radialen Gliazellen in der Retina des Wildtyps nachzuweisen sind, ist bereits eine hohe Antigenizität bei den Mutanten zu beobachten (Abb. 3.15B,D).



**Abb. 3.15:** Frühzeitige und verstärkte Differenzierung *zrf1*-positiver Gliazellen in der Retina von Nachkommen aus Kreuzungen des dID-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A,B) Transversaler Schnitt durch ein Auge eines zwei Tage alten wildtypischen (A) bzw. mutanten (B) Embryos. (C,D) Transversaler Schnitt durch ein Auge eines drei Tage alten wildtypischen (C) bzw. mutanten (D) Organismus. (E,F) Transversaler Schnitt durch ein Auge eines sechs Tage alten wildtypischen (E) bzw. mutanten (F) Organismus.

*hsp*-Aktivator x NIC-Effektor:

Hitzeschocks bei 27 und 35 Stunden führen zu einer starken Antigenizität im inneren zentralen Bereich der Retina von drei Tage alten Mutanten (Abb. 3.16B,C). Wurde der Hitzeschock bei 48 Stunden durchgeführt, so läßt sich nur eine schwache Antigenizität in peripheren Regionen beobachten (Abb. 3.16D).



**Abb. 3.16:** Frühzeitige Differenzierung *zrf1*-positiver Gliazellen in der Retina von zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten hitzegeschockten Nachkommen aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators mit dem NIC-Effektor. (A-D) Transversale Schnitte durch Augen drei Tage alter Organismen. (A) Mit 27 Stunden hitzegeschockter wildtypischer Organismus. (B) Mit 27 Stunden hitzegeschockter mutanter Organismus. (C) Mit 35 Stunden hitzegeschockter mutanter Organismus. (D) Mit 48 Stunden hitzegeschockter mutanter Organismus.

Die Expression von aktiviertem Notch sowohl unter Kontrolle des *deltaD*- wie auch des *hsp70*-Promotors führt also zu einer verstärkten Ausprägung von glialem Zellschicksal in der Retina mutanter Organismen. Diese Zellen durchziehen die Retina mit ihren Fortsätzen und gleichen somit den Müllerschen Gliazellen. Inwieweit diese Zellen tatsächlich funktionelle Müllersche Gliazellen sind, kann anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig entschieden werden. Da der Zellkörper mit dem *zrf1*-Antikörper scheinbar nicht stark gefärbt wird, ist auch nicht eindeutig zu erkennen, wo in der Retina der Zellkörper der *zrf1*-positiven Gliazellen liegt.

### **3.7.9 Untersuchung des zeitlichen Verhältnisses der Expression von aktiviertem Notch und der Ausprägung von glialem Zellschicksal in der Retina**

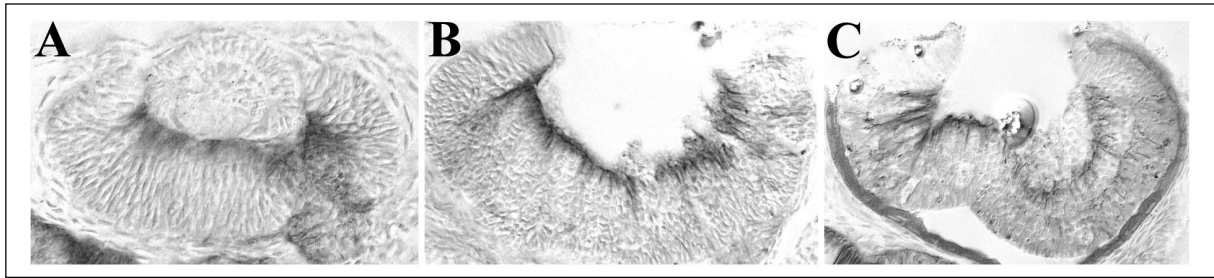
In manchen Studien aus *Xenopus*; Hühnchen, Ratte und Maus wurde berichtet, dass die Aktivierung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges in der Retina und dem Neuralrohr Zellen in einem undifferenzierten Zustand hält (Coffman et al., 1993; Henrique et al., 1995; Chitnis et al., 1995; Dorsky et al., 1995; Tomita et al., 1996; Henrique et al., 1997; Appel et al., 1998), während die Ergebnisse dieser Arbeit, wie mittlerweile auch einiger Anderer (Furukawa et al., 2000; Morrison et al., 2000; Gaiano et al., 2000), darauf hindeuten, dass aktiviertes Notch neurale Vorläuferzellen in ein gliales Zellschicksal führt. Für diese Differenzen könnten experimentelle Unterschiede verantwortlich sein. Ein solcher



Unterschied besteht darin, dass bei den Lipofektions-Experimenten in *Xenopus* und den retroviralen Infektionen in Hühnchen, Ratte und Maus das Zielgen konstitutiv in den betroffenen Zellen exprimiert wird, während in der vorliegenden Arbeit eine regulierte Missexpression stattfindet. Da in dieser Arbeit die Expression des Effektorgens unter der Kontrolle von Promotoren steht, deren Aktivität in der normalen Entwicklung mit der Zeit herunterreguliert wird, ist anzunehmen, dass auch die Expression des Effektorgens im Laufe der Entwicklung abgeschaltet wird. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass Zellen in einem undifferenzierten Zustand gehalten werden, solange sie aktiviertes Notch exprimieren und erst das gliale Schicksal annehmen, wenn die Expression herunterreguliert wird. Um das zu testen, wurden Embryonen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit dem NIC-Effektor auf zwei Arten untersucht:

Mit 27 Stunden wurden die Embryonen einem Hitzeschock unterzogen, mit 48 Stunden fixiert und eine zrf1-Antikörperfärbung durchgeführt. Da aus vorherigen Analysen bekannt war, dass bei entsprechenden Hitzeschocks das Effektorprotein zum Fixierungszeitpunkt noch sehr stark in fast allen Zellen der Retina exprimiert wird (siehe Kapitel 3.7.3), wäre zu vermuten, dass es noch zu keiner Ausprägung von glialem Schicksal kommen kann, falls aktiviertes Notch die Zellen in einem undifferenzierten Zustand hält. Wie Abb. 3.17A zeigt, lassen sich zu diesem Zeitpunkt aber schon relativ viele Fortsätze von Gliazellen erkennen. Offensichtlich schließen sich die gleichzeitige Expression des glialen Markers und von aktiviertem Notch also nicht aus.

2. Mit drei Tagen fixierte Embryonen wurden einem einzigen Hitzeschock bei 30 Stunden oder mehreren aufeinanderfolgenden Hitzeschocks bei 30, 48 und 56 Stunden unterzogen. Mit den wiederholten Hitzeschocks sollte die Expression von aktiviertem Notch über einen längeren Entwicklungszeitraum aufrechterhalten werden. Es wäre anzunehmen, dass durch die wiederholten Hitzeschocks und durch die Persistenz des Effektorproteins weniger Zellen das gliale Schicksal annehmen, falls aktiviertes Notch die Zellen in einem undifferenzierten Zustand hält, als das bei einem einmaligen Hitzeschock der Fall ist. Tatsächlich zeigen mehrfach hitzegeschockte Embryonen aber ein vergleichbares Ausmaß an Glialisierung wie man es bei einfach hitzegeschockten beobachtet (Abb. 3.17B,C).



**Abb. 3.17:** Frühzeitige Differenzierung *zrf1*-positiver Gliazellen in der Retina von Nachkommen aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators mit dem NIC-Effektor bei gleichzeitiger Expression von aktiviertem Notch. (A) Transversaler Schnitt durch ein Auge eines mit 27 Stunden hitzegeschockten und mit 48 Stunden fixierten Embryos. Man beachte, dass die meisten Zellen der Retina von mit 24 Stunden hitzegeschockten und 30 Stunden später fixierten Embryonen immer noch das Effektorprotein exprimieren (Abb. 3.7F). (B,C) Transversale Schnitte durch Augen dreitägiger Organismen, die einem einzigen Hitzeschock bei 30 Stunden (B) oder mehreren aufeinanderfolgenden Hitzeschocks bei 30, 48 und 56 Stunden (C) unterzogen wurden.

Diese Daten geben somit keinen Hinweis darauf, dass die glialisierten Zellen ihr Schicksal erst annehmen, nachdem kein aktiviertes Notch mehr vorhanden ist. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Zellen der Retina das Effektorprotein früher abbauen als andere und dass diese Zellen dann mit der Expression des glialen Markers beginnen. Leider standen keine geeigneten Marker zur Verfügung, mit denen man die gleichzeitige Expression des Effektorproteins und des glialen Markers hätte nachweisen können.

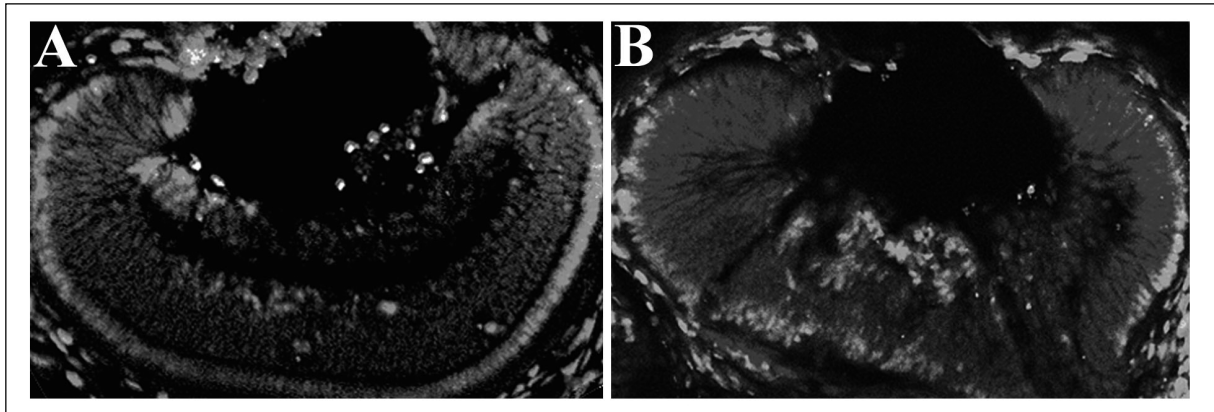
### 3.7.10 Auswirkungen der Expression von aktiviertem Notch auf das Proliferationsverhalten von Zellen im Neuralrohr und in der Retina

Um die Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch auf das Proliferationsverhalten von Zellen zu untersuchen, wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen wurden mittels kumulativer BrdU-Färbung alle teilungsfähigen Zellen des zu untersuchenden Gewebes markiert und zum anderen wurden mit dem phospho-Histon H3-Antikörper alle beim betrachteten Stadium in der Mitose befindlichen Zellen gefärbt.

#### dID-Aktivator x NIC-Effektor:

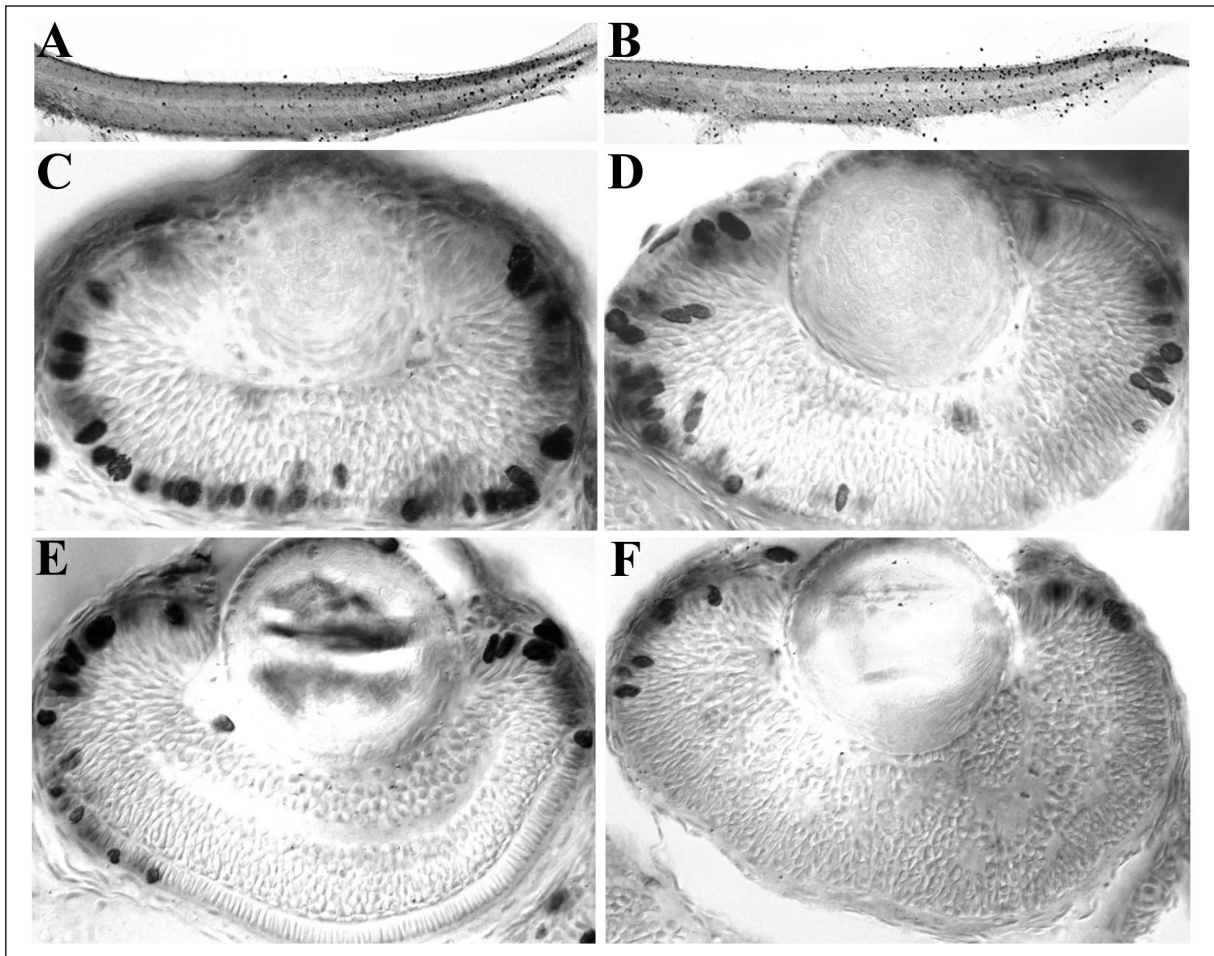
- BrdU-Färbungen: 5 mutante und 12 wildtypische Embryonen wurden bei 32, 35, 38 und 40 Stunden wiederholt mit BrdU injiziert, um eine möglichst vollständige Markierung proliferierender Zellen zu erreichen. Bei 45 Stunden wurden die injizierten Individuen fixiert

und einer yoyo-1 und BrdU-Antikörperfärbung unterzogen. Es wurden Semidünnschnitte hergestellt, die am konfokalen Mikroskop analysiert wurden. Auswertungen dieses Materials zeigen keinen erkennbaren Unterschied in der Zahl und in der Anordnung BrdU-positiver Zellen in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.18A,B). Eine statistische Analyse des Materials wurde allerdings nicht vorgenommen.



**Abb. 3.18:** BrdU-Aufnahme in Zellen der Retina bei mit 32, 35, 38 und 40 Stunden wiederholt mit BrdU injizierten und mit 45 Stunden fixierten Embryonen. (A) Wildtypischer Embryo. (B) Mutanter Embryo aus einer Kreuzung des dID-Aktivators mit dem NIC-Effektor. Die Kerne aller Zellen sind mit yoyo-1 gefärbt (rot). Zellen, die BrdU aufgenommen haben sind durch eine BrdU-Antikörperfärbung sichtbar gemacht (grün). Durch die Überlagerung der beiden Färbungen erscheinen die BrdU-positiven Zellen gelb.

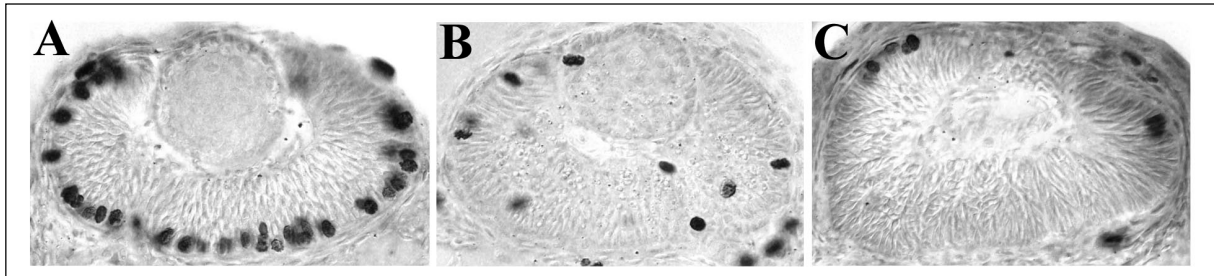
- H3-Antikörperfärbungen: Bei mit 50 Stunden fixierten Mutanten konnte kein wesentlicher Unterschied in der Zahl der in Mitose befindlichen Zellen im Neuralrohr und in der Retina im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 3.19A-D). Beim Vergleich der Zahl der H3-positiven Zellen in der Retina von drei Tage alten Mutanten und Wildtypen fällt auf, dass es deutlich mehr teilungsaktive Zellen beim Wildtyp gibt (Abb. 3.19E,F). Um diese Aussage auch statistisch erfassen zu können, wurden die in der Mitose befindlichen Zellen der Retina beider Augen von 2 mutanten und 4 wildtypischen Embryonen gezählt (siehe auch Tabelle 7.4 im Anhang). Während sich beim Wildtyp im Durchschnitt  $368 \pm 60$  Zellen pro Auge in der Mitose befanden, waren es bei der Mutante  $172 \pm 40$ . Für das Neuralrohr wurde eine entsprechende statistische Auswertung bisher nicht durchgeführt, aber die bloße Betrachtung der gefärbten Objekte deutet ebenfalls nicht auf eine erhöhte Teilungsaktivität bei den Mutanten hin.



**Abb. 3.19:** Teilungsverhalten von Zellen im Neuralrohr und in der Retina bei Nachkommen aus Kreuzungen des *dID*-Aktivators mit dem NIC-Effektor, untersucht durch H3-Antikörperfärbungen. (A,B) Rumpf und Schwanz eines 50 Stunden alten wildtypischen (A) bzw. mutanten (B) Embryos. (C,D) Transversaler Schnitt durch ein Auge eines 50 Stunden alten wildtypischen (C) bzw. mutanten (D) Embryos. (E,F) Transversaler Schnitt durch ein Auge eines drei Tage alten wildtypischen (E) bzw. mutanten (F) Organismus.

**hsp-Aktivator x NIC-Effektor:**

- H3-Antikörperfärbungen: Bei mit 30 Stunden hitzegeschockten und mit 47 Stunden bzw. drei Tagen fixierten Mutanten konnte kein wesentlicher Unterschied in der Zahl der in Mitose befindlichen Zellen im Neuralrohr im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (nicht gezeigt). In der Retina waren in der Mutante sogar deutlich weniger Zellen in der Mitose als im Wildtyp (Abb. 3.20A-C; Tabelle 7.4 im Anhang). Die statistische Auswertung ergab, dass es bei 47 Stunden in der Mutante  $74 \pm 4$  H3-positive Zellen pro Auge gab im Vergleich zu  $538 \pm 46$  beim Wildtyp. Bei drei Tagen waren es  $68 \pm 17$  Zellen in der Mutante im Vergleich zu  $368 \pm 60$  beim Wildtyp.



**Abb. 3.20:** Teilungsverhalten von Zellen in der Retina bei mit 30 Stunden hitzegeschockten Nachkommen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit dem NIC-Effektor, untersucht durch H3-Antikörperfärbungen. (A,B) Transversaler Schnitt durch ein Auge eines 47 Stunden alten wildtypischen (A) bzw. mutanten (B) Embryos. (C) Transversaler Schnitt durch ein Auge eines drei Tage alten mutanten Organismus. Vgl. (C) mit Abb. 3.19E.

Weiterhin konnte bei der reinen Betrachtung von Semidünnschnitten der Retina von drei Tage alten Mutanten aus Kreuzungen des NIC-Effektors mit dem dID- bzw. hsp-Aktivator keine Reduktion der Zellzahl gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden (siehe Abb. 3.11 und 3.12). Es entsteht im Gegenteil der Eindruck, dass es mehr Zellen beim Wildtyp gibt, als bei beiden Mutanten.

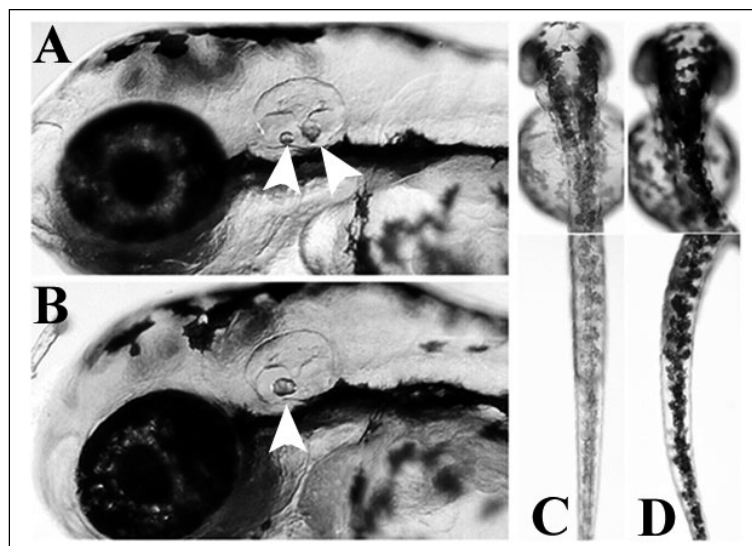
Und schließlich zeigten Injektionen eines Lebendfarbstoffes in retinale Vorläuferzellen von Mutanten aus Kreuzungen des NIC-Effektors mit dem dID-Aktivator keine signifikante Erhöhung der Zellzahl in den resultierenden Klonen im Vergleich zu Kontrollinjektionen beim Wildtyp. Es wurde lediglich ein Unterschied in der zellulären Zusammensetzung der Klone beobachtet (A. Groth, persönliche Mitteilung).

### 3.7.11 Weitere Effekte der Expression von aktiviertem Notch

Außer den bereits beschriebenen Effekten auf Zellschicksalsentscheidungen im Neuralrohr und in der Retina wurde eine Reihe von weiteren Effekten beobachtet, die nicht näher charakterisiert wurden. Diese wurden teilweise bereits in Kapitel 3.7.2 beschrieben und werden hier kurz zusammengefasst.

dID-Aktivator x NIC-Effektor:

- Otolithen: Bei den Otolithen handelt es sich um kristalline Strukturen des Innenohres, deren relative Bewegung zum umliegenden Epithelium zu einer Biegung der Haarzellen des Ohres führt (Whitfield et al., 1996). Diese Reize erlauben dem Fisch eine Orientierung im Raum. Bei 72 Stunden befinden sich die beiden Otolithen des Wildtyps an relativ invariablen Positionen (Whitfield et al., 1996; Abb. 3.21A). Bei einigen mutanten Nachkommen aus Kreuzungen des dID-Aktivators mit dem NIC-Effektor ist nur ein Otolith zu erkennen (Abb. 3.21B). Dieser Phänotyp tritt allerdings nicht bei allen Mutanten auf. Ob diese Beobachtung mit der von anderen beschriebenen Funktion des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei Zellschicksalsentscheidungen im Innenohr (Haddon et al., 1998; Lewis et al., 1998; Riley et al., 1999) im Zusammenhang steht, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.
- Pigmentierung: Embryonen und Larven aus diesen Kreuzungen zeigen eine deutlich stärkere Pigmentierung, als wildtypische Organismen entsprechender Stadien (Abb. 3.21C,D). Es ist also denkbar, dass der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg bei Zellschicksalsentscheidungen von Neuralleistenzellen eine Funktion hat.

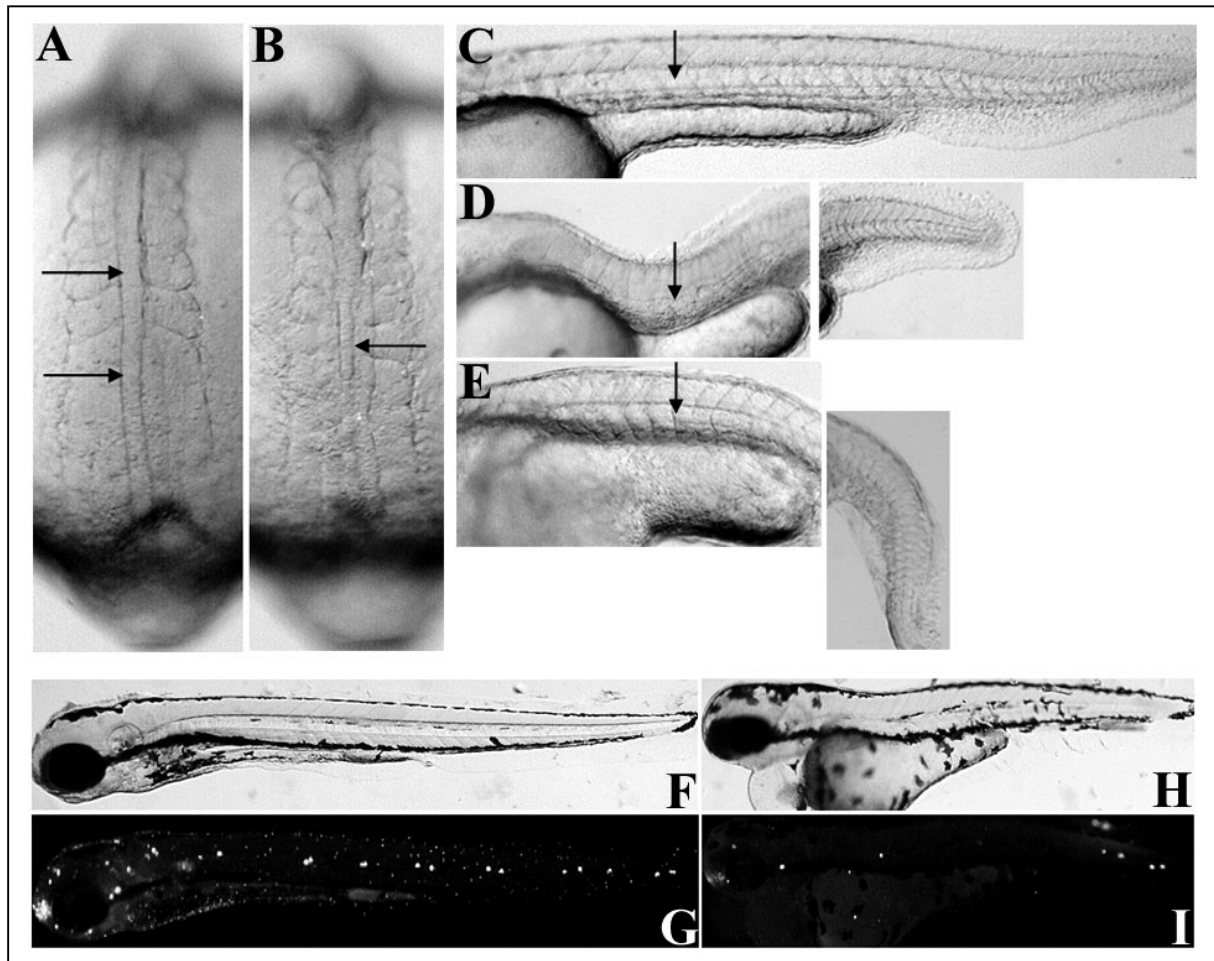


**Abb. 3.21:** Nicht genauer untersuchte Effekte der Expression von aktiviertem Notch unter Kontrolle des Promotors. (A,B) Im Gegensatz zu den zwei Otolithen, die sich an invariablen Positionen im Innenohr von drei Tage alten Wildtypen befinden (Pfeilspitzen in (A)), besitzen Mutanten aus Kreuzungen des dID-Aktivators mit dem NIC-Effektor oft nur ein Otolith (Pfeilspitze in (B)). (C,D) Zweige alte mutante Nachkommen aus Kreuzungen des dID-Aktivators mit dem NIC-Effektor (D) zeigen eine deutlich stärkere Pigmentierung als gleichaltrige wildtypische Embryonen (C).

- Größe: Aufgrund der Tatsache dass mutante Larve grundsätzlich etwas größer erschienen als wildtypische Organismen entsprechender Stadien, wurde eine Computer-unterstützte Messung der Körperlänge von fünf willkürlich ausgewählten mutanten und wildtypischen Larven (fünf Tage nach der Befruchtung) aus verschiedenen Kreuzungen vorgenommen. Die fünf Messungen der Mutanten (4,754, 4,183, 4,303, 4,509 und 4,309 mm) und der Wildtypen (4,77, 3,891, 4,177, 4,037 und 4,064 mm) zeigen, dass die Mutanten in ihrer anterior-posterioren Ausdehnung durchschnittlich tatsächlich etwas größer sind als der Wildtyp (4,36 +/- 0,13 mm im Vergleich zu 4,07 +/- 0,12 mm). Dabei handelt es sich natürlich nur um eine sehr grobe Statistik. Auf welche Art Weise aktiviertes Notch die Körpergröße beeinflusst und warum die Auswirkung von dessen Expression mit dem Aktivator gegenläufig zu dem Effekt bei der Expression mit dem hsp-Aktivator (Kapitel 3.7.2) ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

#### hsp-Aktivator x NIC-Effektor:

- Notochord: Wie bereits in Kapitel 3.7.2 beschrieben hat die Expression von aktiviertem Notch in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Hitzeschocks starke Auswirkungen auf die Entwicklung des Notochords. Bei mit 30 % Epibolie hitzegeschockten Embryonen, also unmittelbar vor der Involution der ersten mesodermalen Zellen, ist eine deutliche Reduktion des Notochords bei Embryonen im 10 Somiten-Stadium zu erkennen (Abb. 3.22A,B). Dieser Effekt läßt sich auch an älteren Stadien beobachten (Abb. 3.22C-E). Bei Embryonen, die im Schwanzknospen-Stadium hitzegeschockt wurden, sieht das Notochord im Rumpfbereich relativ normal aus und die Effekte beschränken sich hauptsächlich auf den Schwanz (Abb. 3.22E), also denjenigen Bereich in dem das Notochord nach dem Hitzeschock entstanden ist. Je später der Hitzeschock durchgeführt wurde, desto weiter nach posterior verschieben sich die Effekte auf das Notochord. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit der vermuteten Funktion des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei Zellschicksalsentscheidungen zwischen Notochord-, Hypochord- und Bodenplattenvorläuferzellen (Appel et al., 1999; siehe auch Kapitel 1.2). Ob die durch die Expression von aktiviertem Notch hervorgerufene Reduktion von Notochordzellen von einer erhöhten Zahl von Hypochord- und Bodenplattenzellen begleitet wird, wie die Hypothese von Appel et al. nahelegt, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.



**Abb. 3.22:** Nicht genauer untersuchte Effekte der Expression von aktiviertem Notch unter Kontrolle des *hsp70*-Promotors. (A,B) Bei 50 % Epibolie hitzegeschockte mutante Embryonen aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators mit dem NIC-Effektor zeigen bei 10 Somiten eine starke Reduktion des Notochords (Pfeil in (B)) im Vergleich zu auf die gleiche Weise behandelten wildtypischen Embryonen (Pfeile in (A)). (C-E) Das Notochord von 24 Stunden alten mutanten Embryonen aus diesen Kreuzungen (D) ist, im Vergleich zu dem von wildtypischen Embryonen (C), insbesondere im Rumpfbereich ebenfalls stark reduziert. Wurde der Hitzeschock im Schwanzknospen-Stadium durchgeführt, so sieht das Notochord mutanter Embryonen im Rumpfbereich relativ normal aus und der Effekt beschränkt sich auf weiter posteriore Regionen (E). Auch die Somiten besitzen bei den Mutanten eine abnorme Gestalt. (F-I) Mit 33 Stunden hitzegeschockte Mutanten aus diesen Kreuzungen (H,I) zeigen, im Vergleich zum Wildtyp (F,G), zwei Tage später eine starke Reduktion der Neuromasten im Kopf und im Rumpf. (F,H) Durchlicht. (G,I) Fluoreszenz.

- Somiten: Auch die Somiten zeigen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Hitzeschocks eine abnorme Gestalt. Die im Wildtyp zu beobachtende pfeilförmige Struktur, ist bei Somiten, die nach dem Zeitpunkt des Hitzeschocks entstanden sind, deutlich abgerundeter (Abb.3.22D,E). Dies erinnert sehr stark an die U-förmige Gestalt von Somiten bei Mutanten mit Notochord-Defekten (van Eeden, 1996; Schauerte et al., 1998; Karlstrom et al., 1999). Es ist im vorliegenden Fall also nicht zu beurteilen, ob die Expression von aktiviertem Notch einen



direkten Einfluß auf die Bildung der Somiten hat, oder ob es sich um einen sekundären Effekt handelt, der auf Defekte des Notochords zurückzuführen ist. Interessanterweise weichen die mit dem GAL4-System erzielten Effekte auf die Somitenbildung von denen die bei der Expression von aktiviertem Notch durch mRNA-Injektion erzielt wurden deutlich ab (Takke und Campos-Ortega, 1999). Im letzteren Fall wurde beobachtet, dass es zu Defekten bei der Bildung der Somitengrenzen kommt, so dass an vielen Stellen eine Fusion von Somiten auftritt. Etwas vergleichbares wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Dies könnte durch unterschiedliche Expressionsniveaus bedingt sein. So ist beispielsweise auch die Persistenz des Effektorproteins nach dem Hitzeschock in den Somiten deutlich schwächer, als das für andere Gewebe der Fall ist (Kapitel 3.7.3)

- **Neuromasten:** Bei den Neuromasten handelt es sich um sensorische Zellen des Seitenlinienorgans, die klonal sehr eng mit den Haarzellen des Ohres verwandt sind und als spezialisierte Abkömmlinge derselben angesehen werden (Whitfield, 1996). Da die Neuromasten als einzelne Zellen im Kopfbereich und im Rumpf angeordnet sind, scheint deren Entstehung durch Notch-abhängige Selektion prädestiniert. Aus diesem Grund wurden Embryonen mit 33 Stunden hitzegeschockt und zwei Tage später einer Neuromasten-Färbung unterzogen. Wie Abb. 3.22F-I zeigt ist die Zahl von Neuromasten im Kopf und Rumpf der Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Mit dem *her4*-Aktivator wurde im übrigen keine Reduktion festgestellt. Ob der beobachtete Effekt eine Funktion von Notch der wildtypischen Situation widerspiegelt, oder ob es sich dabei um ein experimentelles Artefakt handelt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

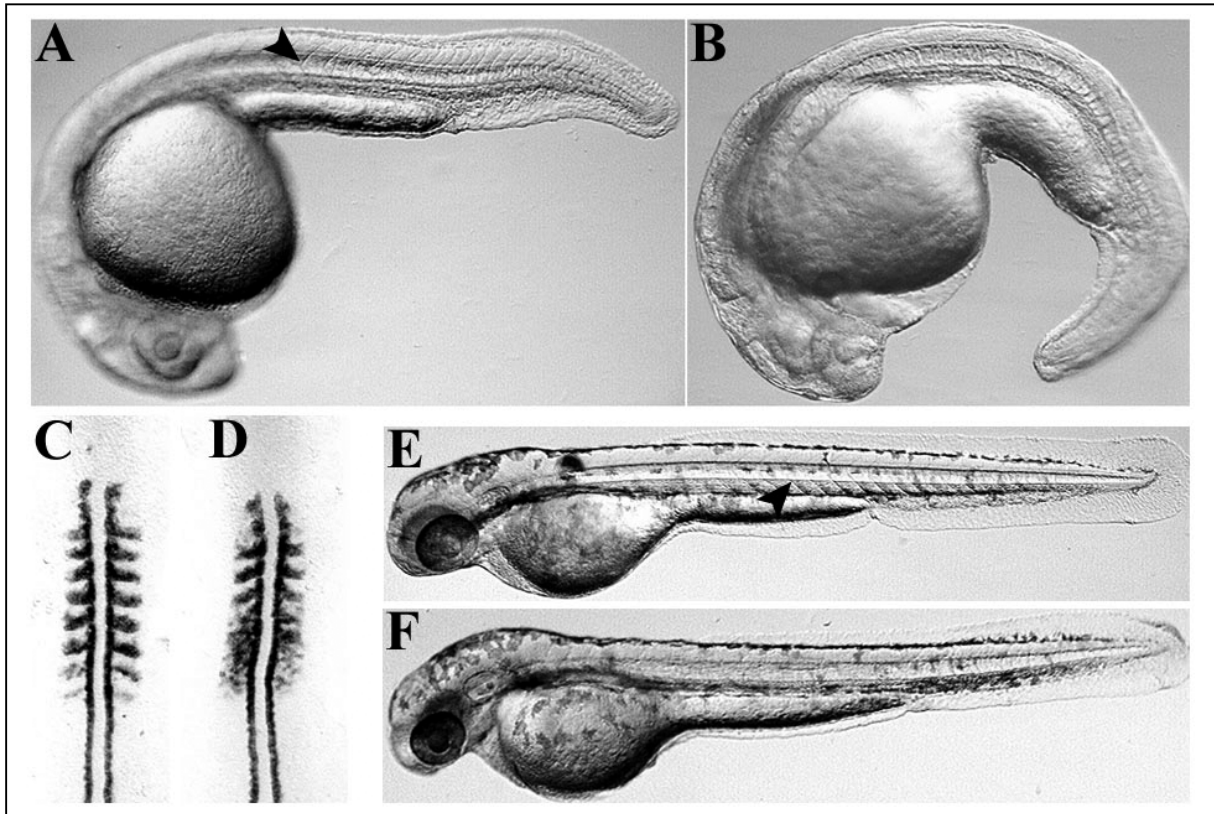
### **3.7.12 Die Missexpression von *her4* mit Hilfe des *hsp*-Aktivators führt zu starken somitischen Defekten**

Bisher wurden nur sehr wenige Funktionsanalysen mit *her4* unter der Verwendung des GAL4-Systems durchgeführt. Nachkommen aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators mit dem UAS-*her4* Effektor (Insertion Nr. 5), der sich wie in Kapitel 3.6 beschrieben als stark transaktivierbar herausgestellt hatte, zeigten bei Hitzegeschocks an unterschiedlichen Stadien starke phänotypische Effekte. Diese waren offensichtlich auf die Missexpression des Effektorgens zurückzuführen (siehe unten). Hitzegeschocks zu gleichen Stadien und unter gleichen Bedingungen an Embryonen aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators gegen UAS-*her4* transgene Organismen mit anderen Insertionen (Nr. 2, 13 und 61) zeigten hingegen keine

erkennbaren phänotypischen Auswirkungen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass sich diese Insertionen als gar nicht oder nur schwach transaktivierbar herausgestellt hatten (Kapitel 3.6). Organismen mit der UAS-her4 Insertion Nr.56 werden im folgenden als „der her4-Effektor“ bezeichnet.

Hitzeschocks an Embryonen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit dem her4-Effektor bei 50 % Epibolie führen zu sehr starken somitischen Defekten. Dies wird offensichtlich bei der Betrachtung von 24 Stunden alten mutanten Embryonen, bei denen die im Wildtyp zu beobachtenden klaren Grenzen zwischen den Somiten im anterioren Bereich des Rumpfes weitgehend aufgehoben sind (Abb. 3.23A,B). Um zu überprüfen, ob sich diese morphologischen Defekte auch auf molekularer Ebene widerspiegeln, wurden bei mit 50 % Epibolie hitzegeschockte Embryonen bei ca. 10 Somiten fixiert und einer *myoD in situ* unterzogen. *myoD* wird in diesem Stadium unter anderem in transversalen Streifen, die den myotomalen Anteil der Somiten markieren, exprimiert (Weinberg et al., 1996). Wie in Abb. 3.23C,D gezeigt, läßt sich bei ca. 1/4 der hitzegeschockten Embryonen (5 von 23) aus Kreuzungen zweier für das jeweilige Transgen heterozygoter Eltern eine starke Disorganisation des wildtypischen *myoD*-Musters erkennen. Während die am weitesten anterior gelegenen *myoD*-Streifen normal aussehen, kommt es zu einer Auflösung des Streifenmusters im posterioren Bereich. Die Expression beschränkt sich hier nicht nur auf einen Streifen innerhalb der Somiten, sondern sie erstreckt sich über das gesamte paraxiale Mesoderm. Um sicherzustellen, dass dieser Effekt nicht auf den Hitzeschock oder die Gal4-Expression zurückzuführen ist, wurden Kontrollexperimente mit hitzegeschockten Embryonen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit einem Wildtyp-Fisch durchgeführt. Bei keinem der getesteten Embryonen (0 von 31) ließ sich unter den gleichen Bedingungen ein vergleichbarer Effekt nachweisen. Ein Nachweis für den kausalen Zusammenhang zwischen der Missexpression von *her4* und der Disorganisation der *myoD*-Streifen wurde bisher allerdings nicht erbracht.

Interessanterweise entwickeln sich die bei 50 % Epibolie hitzegeschockten Embryonen mit Ausnahme der somitischen Defekte und leichter Bewegungsabnormalitäten im Laufe der Zeit relativ normal. Mit 50 Stunden zeigen die Mutanten beispielsweise eine normale Körperform (Abb. 3.23E,F), die Larven schlüpfen von selbst aus dem Chorion und sie sind bis zum 5. Tag nach der Befruchtung lebensfähig. Danach wurden keine Untersuchungen mehr vorgenommen.



**Abb. 3.23:** Bei Nachkommen aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators mit dem *her4*-Effektor führen Hitzeschocks bei 50 % Epibolie zu starken somitischen Defekten. (A,B) Bei 24 Stunden alten mutanten Embryonen (B) sind, im Gegensatz zu wildtypischen Embryonen (A), keine scharfen Grenzen zwischen den Somiten im Rumpfbereich zu erkennen. Die Pfeilspitze in (A) deutet auf eine solche Grenze beim Wildtyp. (C,D) Die beim Wildtyp deutlich voneinander getrennten transversalen *myoD*-Streifen im myotomalen Anteil der Somiten (C), sind bei  $\frac{1}{2}$  der Embryonen aus Kreuzungen zweier für das jeweilige Transgen heterozygoter Eltern im posterioren Bereich fusioniert. (E,F) Abgesehen von den somitischen Defekten haben 50 Stunden alte mutante Embryonen (F) große Ähnlichkeit mit wildtypischen Embryonen des gleichen Alters (E).

Hitzeschocks im 12 Somiten-Stadium und bei 24 Stunden führen ebenfalls zu phänotypischen Effekten (nicht gezeigt). Dabei ist die allgemeine Normalentwicklung überraschenderweise viel stärker betroffen als das bei den Hitzeschocks an früheren Stadien der Fall ist. Sowohl bei mit 12 Somiten, wie auch mit 24 Stunden hitzegeschockten Embryonen sind die Augen stark unterentwickelt, der Körper wirkt entlang seiner anterior-posterioren Achse gestaucht, es entwickelt sich ein Ödem im Herzsack, die Mutanten sind kaum in der Lage sich fortzubewegen und sie sterben mit ca. fünf Tagen nach der Befruchtung. Zusammengefasst gleichen die Effekte der zu späteren Zeitpunkten hitzegeschockten Embryonen denen, die bei der Expression von aktiviertem Notch erzeugt wurden, mehr als jene die auf Hitzeschocks bei 50 % Epibolie zurückzuführen sind.

Eine weitergehende Analyse dieser Phänotypen wurde bisher nicht vorgenommen. Um sicherzustellen, dass die beschriebenen Effekte tatsächlich auf die Missexpression von *her4* zurückzuführen sind, wurden PCR-Analysen an mutanten und wildtypischen Embryonen aus Kreuzungen zweier für das jeweilige Transgen heterozygoter Eltern vorgenommen. Dabei wurden insgesamt 12 wildtypische Embryonen (je 4 bei 50 %, 12 Somiten und 24 Stunden hitzegeschockte) und 8 mutante Embryonen (je 3 bei 50 % und 12 Somiten und 2 mit 24 Stunden hitzegeschockte) getestet. Bei allen getesteten Mutanten ließen sich sowohl das Aktivator- und das Effektor-konstrukt nachweisen, während bei 11 der 12 getesteten wildtypischen Embryonen das eine, das andere oder gar kein Konstrukt vorhanden war. Nur in einem Fall (Hitzeschock bei 50 % Epibolie) waren bei einem als wildtypisch eingestuften Nachkommen beide Konstrukte nachweisbar. Die beschriebenen Effekte sind also mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Missexpression von *her4* zurückzuführen. Die Tatsache, dass ein als wildtypisch eingestufte Embryo beide Konstrukte trug, kann auf eine fehlerhafte Klassifizierung zurückzuführen sein (für die Unterscheidung von bei 50 % Epibolie hitzegeschockten wildtypischen und mutanten Embryonen ist eine genaue Beobachtung unter dem Stereomikroskop erforderlich), auf bei PCR-Analysen immer wieder auftretende Kontaminationsprobleme oder auf eine nicht 100 %ige Penetranz des erzeugten Phänotyps.

### **3.7.13 Die Missexpression von *sonic hedgehog* mit Hilfe des hsp-Aktivators führt zu starken Defekten bei der Entwicklung der Augen und des Gehirns**

Die im folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden durch Kreuzungen des hsp-Aktivators mit transgenen Organismen mit den UAS-shh Insertionen Nr.7 und 36 erzielt. Soweit getestet, ergaben sich keine Unterschiede für diese beiden Insertionen, so dass die entsprechenden transgenen Organismen als shh-Effektoren zusammengefasst werden.

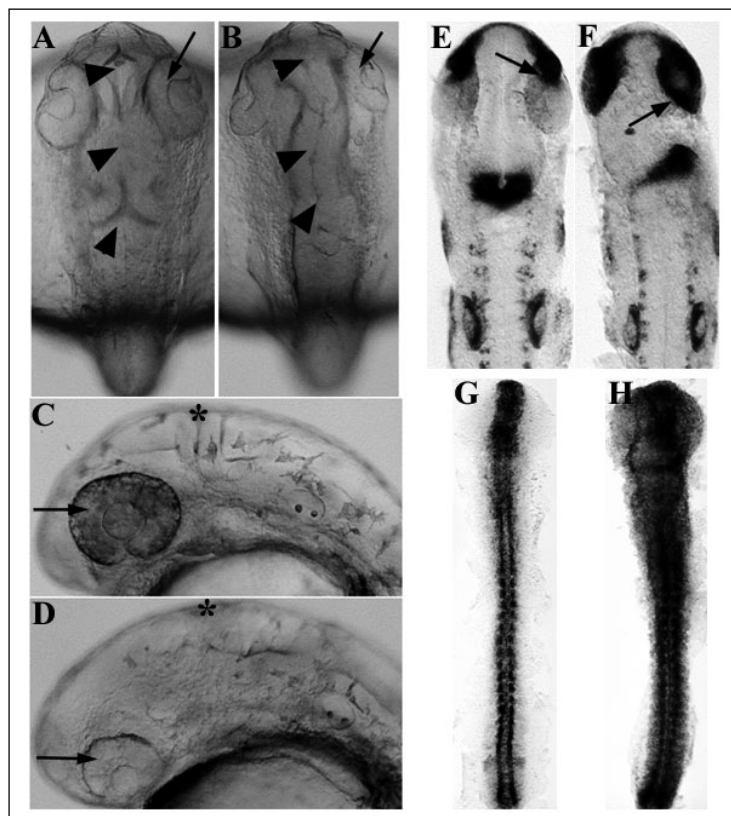
Die anfänglichen Experimente an Embryonen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit dem shh-Effektor wurden unter den gleichen Hitzeschock-Bedingungen durchgeführt wie bei den Experimenten mit den NIC- und *her4*-Effektoren (30 min bei 40°C). Hitzeschocks an unterschiedlichen Stadien (50 % Epibolie, 12 Somiten und 24 Stunden) führten allerdings zu keinen erkennbaren Effekten, obwohl sich das Effektorgen unter diesen Bedingungen eindeutig transaktivieren ließ (siehe Kapitel 3.6). Aus diesem Grund wurde getestet, ob durch Erhöhung der Hitzeschock-Temperatur und die dadurch vermutete Verstärkung der Expression des Effektorgens phänotypische Effekte erkennbar würden. Bei Embryonen die

mit 50 % Epibolie für 30 Minuten bei 41°C hitzegeschockt wurden ließ sich in der Tat ein starker Effekt auf die Entwicklung der Augen und des Gehirns beobachten. Untersuchungen von 24 Stunden alten Embryonen aus Kreuzungen zweier für das jeweilige Transgen heterozygoter Eltern, die unter den beschriebenen Bedingungen hitzegeschockt wurden, zeigten eine deutliche Reduzierung der Augenvesikel bei ca. 1/4 der Embryonen (Abb. 3.24A-D). Diese Embryonen zeichneten sich außerdem durch die Abwesenheit der im Wildtyp charakteristischen Struktur des Isthmus aus (Abb. 3.24C,D). Dieser entsteht durch die dorsale Auswölbung des posterioren Teils des Mittelhirns und des ersten Rhombomeres des Hinterhirns und stellt somit die morphologische Ausprägung der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze dar (Brand et al., 1996). Ein weiteres phänotypisches Merkmal dieser Embryonen besteht in der fehlenden Ausbildung der Gehirnventrikel, welche Auswölbungen des Lumens des Neuralrohrs an spezifischen Stellen des Gehirns darstellen (Abb. 3.24A,B). Da diese Effekte in sehr guter Übereinstimmung mit den beobachteten Effekten der ersten mRNA-Misexpressionsstudien von *shh* im Zebrafisch stehen (Ekker et al., 1995), wurde getestet, ob die in diesen Studien beschriebene Änderung von distalen zu proximalen Zellschicksalen im Augenvesikel auch für die Experimente mit dem hsp-Aktivator zutreffen. Ein geeigneter Marker um dies zu überprüfen ist *pax2*, der im Wildtyp nur im proximalen, also dem optischen Stiel zugewandten Anteil des Auges exprimiert wird. Entsprechend der Ergebnisse von Ekker et al. konnte auch bei den Experimenten in dieser Arbeit eine Ausbreitung der *pax2*-Expression über das gesamte Auge und somit eine Änderung von distalem zu proximalem Schicksal festgestellt werden (Abb. 3.24E,F).

Aufgrund der extremen Hitzeschock-Bedingungen ist bei der Beurteilung dieser Ergebnisse die Korrelation der Misexpression von *shh* mit den beobachteten Phänotypen von besonderer Bedeutung. Deshalb wurden PCR-Analysen an mutanten und wildtypischen Embryonen aus Kreuzungen zweier für das jeweilige Transgen heterozygoter Eltern vorgenommen. Von den 7 getesteten Embryonen, die unter den beschriebenen Hitzeschock-Bedingungen einen mutanten Phänotyp zeigten, trugen alle sowohl das Aktivator- wie auch das Effektor-Konstrukt, während bei den 17 getesteten wildtypischen Embryonen entweder das eine, das andere oder gar kein Konstrukt vorhanden war. Die beschriebenen Ergebnisse ließen sich außerdem bei mehreren unabhängigen Versuchen bestätigen. Der beobachtete Phänotyp wird also wahrscheinlich durch die Misexpression von *shh* hervorgerufen.

Weitere Effekte konnten unter den gleichen Hitzeschock-Bedingungen nicht festgestellt werden. Beispielsweise wurden Embryonen bei 50 % Epibolie, im Schwanzknospen-Stadium, bei 2 oder bei 5 Somiten hitzegeschockt, bei 10 Somiten fixiert und einer *islet1 in situ*

unterzogen. In keinem der getesteten Fälle konnte eine offensichtliche Abweichung von dem wildtypischen *islet1*-Muster festgestellt werden. Allerdings ließ sich unter den beschriebenen Bedingungen eine ektopische Expression von *patched1* (*ptc1*) nachweisen. Für *ptc1*, das für einen Shh-Rezeptor kodiert, konnte gezeigt werden, dass dessen Expression positiv von Shh reguliert wird (Concordet et al., 1996). Aus diesem Grunde ist *ptc1* ein geeigneter Indikator für die Anwesenheit von aktivem Shh. Bei mit 12 Somiten hitzegeschockten und mit 20 Somiten fixierten Embryonen aus Kreuzungen zweier für das Aktivator- bzw Effektor-Konstrukt heterozygoter Eltern ist bei ca. 1/4 (5 von 22) eine ubiquitäre Expression von *ptc-1* zu beobachten (Abb. 3.24G,H). Die übrigen Embryonen zeigen das für den Wildtyp charakteristische gewebespezifische Expressionsmuster.



**Abb. 3.24:** Auswirkungen der Missexpression von *shh* unter der Kontrolle des *hsp70*-Promotors. (A-D) Mit 50% Epibolie hitzegeschockte mutante Nachkommen (B,D) aus Kreuzungen des *hsp*-Aktivators mit dem *shh*-Effektor zeigen mit 24 Stunden im Vergleich zum Wildtyp (A,C) eine Reduktion der Augenesikel (Pfeile). Den mutanten Embryonen fehlen außerdem der Isthmus (Sterne) und die Gehirnventrikel (Pfeilspitzen). (E,F) Bei auf die gleiche Weise wie in (B,D) hitzegeschockten mutanten Embryonen kann mit 24 Stunden eine Ausbreitung der *pax2*-Expressionsdomäne über das ganze Auge beobachtet werden (Pfeil in (F)). Diese Domäne ist beim Wildtyp auf den proximalen Teil des Auges beschränkt (Pfeil in (E)). (G,H) \_ der bei 12 Somiten hitzegeschockten Embryonen aus Kreuzungen eines heterozygoten *hsp*-Aktivators mit einem heterozygoten *shh*-Effektor zeigen bei 20 Somiten eine ubiquitäre Expression von *ptc-1* (H). Die übrigen Embryonen zeigen das für den Wildtyp charakteristische gewebespezifische Expressionsmuster (G).

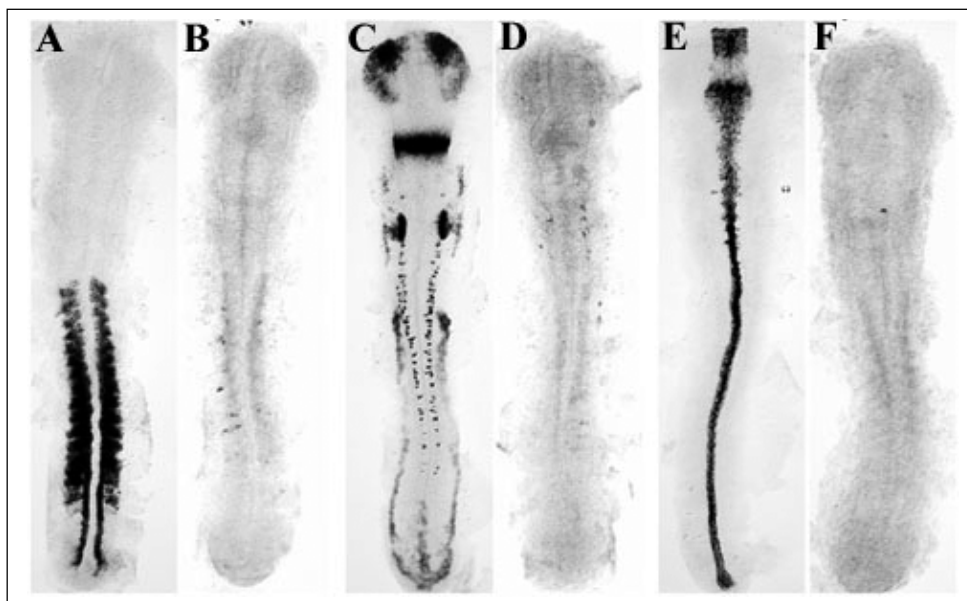
### 3.8 Toxische Eigenschaften von GalAd1 und Gal4

Eine Möglichkeit, um eine höhere Effizienz des GAL4-Systems zu erreichen, bestände in der Verwendung eines stärkeren Transaktivators. So kann durch den Austausch der Transaktivierungsdomäne von Gal4 gegen die virale Transaktivierungsdomäne Vp16 die transkriptionsaktivierende Eigenschaft des Proteins wesentlich gesteigert werden (Sadowski et al., 1988). Eine Gefahr bei der Verwendung von Transaktivierungsdomänen besteht allerdings darin, dass deren Expression auch die normalen Prozesse in einer Zelle stören können, da sie endogene Transkriptionsfaktoren für ihre transaktivierenden Eigenschaften verwenden. Für die Vp16-Transaktivierungsdomäne ist beispielsweise ein starker Einfluß auf die allgemeine Transkriptionsmaschinerie einer Zelle beschrieben (Croston et al., 1991; Croston et al., 1992; Gupta et al., 1996; Nishikawa et al., 1997).

Ein Transaktivator der im Rahmen dieser Arbeit getestet wurde ist das Fusionsprotein GalAd1. Dieses besteht aus der DNA-bindenden Domäne von Gal4 und einer Transaktivierungsdomäne des Maus E2A-Proteins, welches ein Homolog des *Drosophila* bHLH Proteins Daughterless darstellt (Argenton et al., 1996). Es wurde bereits in transienten Versuchen am Zebrafisch getestet und als ein starker Transaktivator mit niedriger Toxizität beschrieben (Argenton et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unabhängige transgene Insertionen des hsp-GALAD1 Konstruktes hergestellt (Insertion Nr.2 und 14). Beide verhielten sich in den getesteten Fällen identisch. Embryonen aus Kreuzungen der hsp-GALAD1 transgenen Fische gegen Wildtypen, die zu verschiedenen Zeiten (Schwanzknospen-Stadium, 12 Somiten oder 24 Stunden) unter relativ milden Bedingungen (30 min bei 38°C) hitzegeschockt wurden, zeigen sehr starke morphologische Defekte. Die Embryonen machen mehrere Stunden nach dem Hitzeschock den Eindruck, als ob sie in ihrem Entwicklungsstadium arretiert wären. So verlängern sich die bei 12 Somiten hitzegeschockten Embryonen z.B. kaum entlang ihrer anterior-posterioren Achse. Die Schwanzknospe bleibt als runde Struktur ohne offensichtliche Differenzierung erhalten und es werden keine zusätzlichen Somiten hinzugefügt. Diese Beobachtungen lassen sich auch auf molekularer Ebene nachweisen. *In situ* Hybridisierungen mit den Markern *pax2*, *myoD* und *shh* an Embryonen die bei 14 Somiten hitzegeschockt und kurze Zeit später fixiert wurden zeigen, dass die Expression dieser Gene fast vollständig abgeschaltet wurde (Abb. 3.25B,D,F). Kontrollfärbungen an wildtypischen Embryonen, die unter den gleichen Bedingungen hitzegeschockt wurden, zeigen keine Veränderung des normalen Expressionsmusters (Abb. 3.25A,C,E). Desweiteren ließen sich bei Hitzeschocks an

Embryonen aus Kreuzungen des NIC-Effektors gegen einen der beiden hsp-GALAD1 transgenen Fische keine Bedingungen finden, bei denen ein eindeutig auf die Expression von aktiviertem Notch zurückzuführender Phänotyp auftritt, aber kein von dem Transaktivator hervorgerufener Effekt. Die hsp-GALAD1 transgenen Fische sind also als Aktivatoren nicht geeignet, da das Transaktivatorprotein selbst eine zu starke Toxizität besitzt.

Um zu testen, ob Gal4 unter sehr starken Expressionsbedingungen auch einen toxischen Effekt hat, wurden Embryonen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit einem wildtypischen Fisch bei 12 Somiten für 45 Minuten bei 42°C hitzegeschockt. Wildtypische Embryonen überleben diese extremen Hitzeschock-Bedingungen zum größten Teil unbeschadet. Embryonen die das hsp-GAL4 Konstrukt tragen (10 von 10 PCR-positiven) zeigen hingegen allgemeine morphologische Effekte in unterschiedlich starker Ausprägung. Bei sehr starker Expression unter extremen Hitzeschock-Bedingungen hat Gal4 also scheinbar auch toxische Eigenschaften, die die Normalentwicklung stören. Allerdings muß betont werden, dass das Expressionsniveau, das durch den *hsp70*-Promotor erreicht wird schon unter milderen Hitzeschock-Bedingungen extrem hoch ist (siehe Kapitel 3.4) und das die Temperaturen und Zeiten bei den Hitzeschocks für die Funktionsanalysen deutlich unter den Werten lagen, bei denen die hier beschriebenen Effekte auftraten.



**Abb. 3.25:** Abschaltung der Expression verschiedener Marker in Embryonen, die den GalAd1-Transaktivator exprimieren. (A-F) *In situ* Hybridisierungen mit den Markern *myoD* (A,B), *pax2* (C,D) und *shh* (E,F) an Embryonen aus Kreuzungen eines heterozygoten hsp-GALAD1 Aktivators (Insertion Nr.2) mit einem Wildtyp, die bei 14 Somiten hitzegeschockt und kurze Zeit später fixiert wurden. Gleichzeitig wurde eine *galad1 in situ* Hybridisierung (rot) durchgeführt. Nur in denjenigen Embryonen, in denen *galad1* exprimiert wird (B,D,F), kommt es zu einer Abschaltung der Genexpression, während die übrigen Embryonen (A,C,E) die wildtypischen Expressionsmuster aufweisen.



## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche zur Etablierung des GAL4-Systems im Zebrafisch durchgeführt. Anhand der vorliegenden Daten kann eine Abschätzung über die Möglichkeiten und Grenzen dieser Methode beim derzeitigen Stand der Technik vorgenommen werden. Ferner wurden mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten transgenen Linien Untersuchungen der Funktion des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei verschiedenen Entwicklungsprozessen durchgeführt. Dabei wurden besonders Zellschicksalsentscheidungen im Neuralrohr und in der Retina genauer analysiert, um den Erkenntnisstand auf diesem Gebiet zu überprüfen und zu erweitern. Verschiedene Funktionen dieses Transduktionsweges bei anderen Entwicklungsprozessen wurden festgestellt, aber aus zeitlichen Gründen bisher nicht weiter analysiert. Die hergestellten Linien stellen somit auch ein Ausgangsmaterial für weitergehende Analysen dar.

### 4.1 Beim Zebrafisch können stabile transgene Insertionen mit reproduzierbarer Expression hergestellt werden

Eine wesentliche Voraussetzung für gezielte Funktionsanalysen mit Hilfe des GAL4-Systems besteht in der Herstellbarkeit transgener Insertionen mit voraussagbarer und reproduzierbarer Expression. Zu Beginn dieser Arbeit waren die Erfahrungen auf diesem Gebiet sehr unterschiedlich. Während durch viele Studien gezeigt war, dass stabile transgene Insertionen beim Zebrafisch relativ einfach hergestellt werden können (Stuart et al., 1988; Stuart et al., 1990; Culp et al., 1991; Bayer und Campos-Ortega, 1992; Lin et al., 1994; Patil et al., 1994; Caldovic und Hackett, 1995), zeigten die Insertionen in den meisten Fällen keine oder nicht die erwartete Expression (Stuart et al., 1988; Stuart et al., 1990; Culp et al., 1991; Lin et al., 1994; Patil et al., 1994). Bei Versuchen von Caldovic und Hackett konnte unter Verwendung von Insulator-Elementen eine nahezu positions-unabhängige reproduzierbare Expression erreicht werden (Caldovic und Hackett, 1995). Die in diesen Studien verwendeten MAR(„matrix attachment region“-)Sequenzen stammen vom Hühnchen-Lysozym Locus und sollen das Transgen vor Einflüssen durch das es umgebende Chromatin schützen. Bei der Verwendung der drei heterologen Promotoren *cmvtk*, *svtk* und *Carp  $\beta$ -actin* wurde auch in dieser Arbeit von den MAR-Sequenzen Gebrauch gemacht. Zumindest für diejenigen Konstrukte, in denen *gal4* unter Kontrolle des *cmvtk*- bzw. *Carp  $\beta$ -actin*-Promotors steht,

konnten unabhängige Insertionen mit sehr ähnlicher Expression hergestellt werden (4 von 4 Insertionen im Falle des *cmv*tk-Promotors und 5 von 5 im Falle des Carp  $\beta$ -*actin*-Promotors). Inwieweit diese reproduzierbare Expression auf die Insulator-Elemente zurückzuführen ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden, da keine Versuche mit den gleichen Konstrukten ohne diese Sequenzen vorgenommen wurden. Warum die Insertionen mit den beiden viralen Promotoren und dem Promotor aus Karpfen in einer stark gewebe-spezifischen Weise exprimiert werden, kann ebenfalls nicht beurteilt werden.

Auch wenn die vorliegenden Ergebnisse aus dem besagten Grund keine Aussagen über den Nutzen der MAR-Sequenzen erlauben, zeigen die Insertionen, bei denen *gal4* unter der Kontrolle des *Xef1 $\alpha$* -, *deltaD*- und *hsp70*-Promotors steht, dass auch ohne Verwendung der Insulatoren eine voraussagbare und reproduzierbare Expression erreicht werden kann. Alle sechs getesteten Insertionen mit dem *Xef1 $\alpha$* -Promotor exprimieren *gal4* in einem sehr ähnlichen Muster. Das gleiche gilt für die vier getesteten Insertionen mit dem *hsp70*-Promotor und für 4 der 5 getesteten Insertionen mit dem *deltaD*-Promotor. Nur bei der Insertion Nr.78 mit dem *deltaD*-Promotor wird *gal4* in einem deutlich anderen und von der endogenen *deltaD*-Expression abweichenden Muster exprimiert. In diesem Fall machen sich also scheinbar Positioneffekte bemerkbar oder das Transgen hat vor oder während seiner Integration in das Genom eine Modifikation erfahren.

Die beschriebenen Ergebnisse stimmen mit neueren Resultaten anderer Gruppen überein, die ebenfalls in der Lage waren, transgene Insertionen mit reproduzierbarer Expression zu erzeugen (Long et al., 1997; Higashijima et al., 1997; Halloran et al., 2000). Die Gemeinsamkeit dieser Studien besteht in der Tatsache, dass Zebrafisch-Promotoren für die Expression des Zielgens verwendet wurden. Der Hauptgrund für die Probleme mit der Expression von transgenen Insertionen in früheren Arbeiten dürfte somit bei den in diesen Studien benutzten heterologen (hauptsächlich viralen) Promotoren liegen. Dies stimmt auch mit der Tatsache überein, dass in dieser Arbeit transgene Insertionen mit heterologen Promotoren im Durchschnitt deutlich schwächer exprimiert werden als jene bei denen endogene Promotoren verwendet wurden (Kapitel 3.4).

## **4.2 Beim Zebrafisch können stabile transgene Insertionen mit transaktivierbaren Effektorgenen hergestellt werden**

Neben der Voraussetzung, dass stabile transgene Insertionen mit reproduzierbarer Expression hergestellt werden können, ist die Möglichkeit zur Erzeugung transgener Linien mit von Gal4 transaktivierbaren Effektorgenen unter Kontrolle von UAS-Sequenzen von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der von einigen Arbeitsgruppen vermuteten Abschaltung von Genexpression bei transgenen Insertionen im Zebrafisch durch Modifikationen (z.B. Methylierung) der transgenen DNA (Culp et al., 1991; Patil et al., 1994; Caldovic und Hackett, 1995; Martin und McGowan, 1995), wäre auch ein entsprechender negativer Einfluß auf die Expression eines UAS-kontrollierten Effektorgens denkbar. Dies gilt um so mehr, als es sich sowohl bei den aus Hefe stammenden UAS-Sequenzen, wie auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Minimalpromotor aus Adenovirus um heterologe Sequenzen handelt. Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, ist eine Voraussage über die Expression eines Zielgens unter der Kontrolle eines heterologen Promotors oft nicht möglich. Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass beim Zebrafisch transgene Insertionen hergestellt werden können, bei denen ein Effektorgen unter Kontrolle von UAS-Sequenzen durch Gal4 transaktivierbar ist. Insbesondere entsprach die Expression der Effektorgene in fast allen getesteten Fällen weitgehend der *gal4*-Expression der Aktivatoren. Von den insgesamt 24 getesteten Linien, bei denen verschiedene Effektorgene unter Kontrolle von UAS-Sequenzen stehen, können 15 (63%) als eindeutig transaktivierbar eingestuft werden (Kapitel 3.6 und Tabelle 5.3 im Anhang). Die Tatsache, dass bei 9 der getesteten potentiellen Effektoren keine Transaktivierung nachgewiesen werden konnte, wie auch die relativ schwache Expression der Effektorgene in manchen Kreuzungen von Aktivatoren und Effektoren, mag aber auf Modifikationen der transgenen Insertionen zurückzuführen sein. In jedem Fall ist die Effektivität der Transaktivierbarkeit bei unabhängigen Insertionen mit einem Konstrukt sehr unterschiedlich. Scheinbar haben Positionseffekte und die Struktur der transgenen DNA am Insertionsort einen großen Einfluß auf die Expressionseigenschaften des Transgens.

Wie auch im Fall der Aktivatoren, so kann bei den Effektoren keine Aussage über den Nutzen der bei manchen Konstrukten verwendeten MAR-Sequenzen gemacht werden. Da transaktivierbare Effektoren sowohl mit als auch ohne Insulator-Elementen hergestellt werden konnten, kann lediglich gesagt werden, dass diese Sequenzen nicht zwingend erforderlich sind.

### **4.3 Das GAL4-System ermöglicht die funktionelle Analyse von Genen durch gezielte Missexpression im Zebrafisch**

Der Grund für die Bedeutung des GAL4-Systems besteht in der Möglichkeit, in Abhängigkeit von den verfügbaren Promotoren eine gezielte räumliche und zeitliche Missexpression eines Effektorgens durchführen zu können und somit eine funktionelle Analyse des Gens vorzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Effektorgene (*notch1a:intra*, *her4* und *sonic hedgehog*) für die Funktionsanalyse verwendet. Für alle drei konnten transgene Organismen hergestellt werden, deren Nachkommen nach Kreuzung mit bestimmten Aktivatorfischen auf die Missexpression des Effektorgens zurückzuführende Abnormalitäten aufwiesen (Kapitel 3.7). Diese Effekte lassen sich mit den vermuteten Funktionen der verwendeten Gene zum großen Teil in Übereinstimmung bringen. Als Aktivatoren für die Versuche zur Funktionsanalyse wurden transgene Organismen verwendet, in denen *gal4* unter Kontrolle der Zebrafisch-Promotoren *deltaD* oder *hsp70* steht. Für beide Promotoren ließen sich also Insertionen finden, die bei Kreuzungen der Aktivatoren gegen bestimmte Effektoren funktionelle Studien an den Nachkommen erlaubten. Diese Ergebnisse zeigen, dass das GAL4-System für Funktionsanalysen von Genen im Zebrafisch geeignet ist (siehe aber auch Kapitel 4.4).

### **4.4 Möglichkeiten und Grenzen des GAL4-Systems zur Funktionsanalyse von Genen im Zebrafisch**

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse erlauben aufgrund der relativ großen Zahl der verwendeten Konstrukte und der Vielzahl transgener Insertionen eine Abschätzung der Möglichkeiten und Grenzen des GAL4-Systems zur Funktionsanalyse von Genen im Zebrafisch.

Die Daten zeigen, dass durch Mikroinjektion erzeugte transgene Insertionen mit einer Rate von 3 – 29 % (Durchschnitt: 9 %) der getesteten potentiellen Gründerfische auftreten (Kapitel 3.1). Dies bedeutet, dass bei einer Zahl von 100 potentiellen Gründerfischen mit mindestens 5 unabhängigen Insertionen zu rechnen ist. Bei einer Überlebensrate von ca. 30 - 50 % der injizierten Embryonen reicht eine Zahl von 200 -300 Injektionen pro Konstrukt aus, um zu 5 unabhängigen Insertionen zu kommen. Eine solche Zahl von Injektionen kann von einem geübten Experimentator mit ca. 4 Injektionsserien erreicht werden, was einem

Arbeitsaufwand von wenigen Stunden entspricht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass unter 5 unabhängigen Insertionen in der Regel Aktivatoren gefunden werden, die zur Transaktivierung in der Lage sind, beziehungsweise Effektoren, die transaktivierbar sind (Kapitel 3.5; Kapitel 3.6; Tabelle 5.3 im Anhang).

Weitaus größer ist der Arbeitsaufwand der Selektion der transgenen Organismen unter den potentiellen Gründerfischen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die transgenen Insertionen ausschließlich durch PCR-Analysen gesichtet. Dies ist relativ aufwendig, da die DNA aus einer Vielzahl von Embryonen extrahiert werden muß und PCR-Reaktionen angesetzt und ausgewertet werden müssen. Insbesondere die Sichtung adulter F<sub>1</sub>-Fische durch PCR-Analysen auf genomischer DNA aus Schwanzflossen ist oft sehr zeitaufwendig, da eine Reihe von Schwanzflossenamputationen und einzelne PCR-Reaktionen notwendig sind. Dies gilt umso mehr, als aufgrund des Keimbahnmosaizismus nur bis zu 1 % der Nachkommen eines PCR-positiven Gründerfisches das Transgen trägt (Kapitel 3.2; Tabelle 5.1 im Anhang). Bei *Drosophila* wird die Selektion transgener Insertionen oft durch die Verwendung eines Markergens, wie z.B. des *white* Gens, in den Konstrukten zur Herstellung der transgenen Organismen erleichtert (siehe z.B. Brand und Perrimon, 1993). Die Konstrukte werden in Eier von *white* Fliegen injiziert und transgene Insertionen lassen sich durch die rote Farbe der Augen einer transgenen Fliege erkennen. In Analogie dazu könnte die Verwendung eines dominanten Markers die Sichtung transgener Insertionen im Zebrafisch erleichtern. Ein solcher Marker wäre das „Green Fluorescent Protein“, Gfp. Es bietet sich deswegen an, da es die Selektion transgener Insertionen an lebenden Organismen erlaubt. Eine Möglichkeit für die Nutzung dieses Markers wäre die Verwendung von Aktivator- oder Effektoronstrukten, die zusätzlich das *gfp*-Gen unter Kontrolle eines im Zebrafisch exprimierten Promotors tragen. Transgene Insertionen könnten somit durch einfache Fluoreszenzbeobachtung gesichtet werden. Wenn man davon ausgeht, dass die Expression von *gfp* und dem zusätzlich im Konstrukt vorhandenen Gen im gleichen Maße von der genomischen Umgebung beeinflusst wird, so bestände ein weiterer Vorteil in der Tatsache, das die Expressionsstärke von *gfp* auch einen Aufschluß über die Expressionseigenschaften des gekoppelten Gens geben kann. Insertionen mit starker und schwacher Expression könnten somit vorab selektioniert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit (Kapitel 3.3; Kapitel 4.1; Tabelle 5.2 im Anhang), wie auch Studien anderer Gruppen (Long et al., 1997; Higashijima et al., 1997; Halloran et al., 2000), zeigen, dass beim Zebrafisch stabile transgene Insertionen mit voraussagbarer und reproduzierbarer Expression erzeugt werden können. Damit ist eine wesentliche Vor-

aussetzung für die Funktionalität des GAL4-Systems erfüllt. Es wurde weiterhin festgestellt, dass transgene Insertionen mit Zebrafisch-Promotoren im Durchschnitt deutlich stärker exprimiert werden als solche, bei denen heterologe Promotoren verwendet wurden (Kapitel 3.4). Zur Zeit werden in vielen Gruppen Analysen von Zebrafisch-Promotoren durchgeführt. Es ist also damit zu rechnen, dass in näherer Zukunft eine ganze Reihe von Zebrafisch-Promotoren verfügbar sein wird, die die Möglichkeiten des GAL4-Systems deutlich verbessern werden. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass verschiedene Arbeitsgruppen sogenannte „enhancer trap“-Versuche beim Zebrafisch im großen Maßstab durchführen (W. Driever, persönliche Mitteilung; E. Raz, persönliche Mitteilung; T. Becker, persönliche Mitteilung). Ein Ziel dieser Experimente, die mit Hilfe von retroviralen Insertionen und Transposons durchgeführt werden, ist unter anderem die Erzeugung transgener Linien bei denen *gal4* zufallsgemäß unter Kontrolle von endogenen Promotoren gerät. Eine Linie, die Gal4 spezifisch in bestimmten Zellen der Nase exprimiert, wurde auf diese Weise bereits hergestellt (W. Driever, persönliche Mitteilung). Falls bei diesen Versuchen eine ausreichende Effizienz erreicht wird, werden auch sie die Möglichkeiten des GAL4-Systems erweitern.

Ein weiterer Vorteil des GAL4-Systems besteht in der Tatsache, dass aufgrund der modularen Natur dieser Technik, zahlreiche unterschiedliche Prozesse analysiert werden können, sobald eine gewisse Anzahl verschiedener Aktivatoren und Effektoren verfügbar ist. Eine Voraussetzung dafür ist, dass viele Gruppen mit dieser Methode arbeiten. In letzter Zeit haben in der Tat eine ganze Reihe unterschiedlicher Labore damit begonnen. Zum Teil wurde auch schon von positiven Resultaten berichtet (W. Driever, persönliche Mitteilung; S. Roy, persönliche Mitteilung). Es wird also in Zukunft in manchen Fällen möglich sein, verschiedene Aktivatoren und Effektoren zu kreuzen, ohne den langwierigen Prozeß der Herstellung neuer transgener Insertionen beschreiten zu müssen.

Trotz all dieser Vorteile und Möglichkeiten gibt es aber auch Grenzen des GAL4-Systems beim momentanen Stand der Technik. Das größte Hindernis besteht dabei im Expressionsniveau. Bei unabhängigen Insertionen mit einem Aktivator-konstrukt gibt es sehr starke Schwankungen im Expressionsniveau (Kapitel 3.4; Tabelle 5.2 im Anhang). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für die Transaktivierbarkeit unabhängiger Insertionen mit einem Effektor-konstrukt gemacht (Kapitel 3.6). Diese Schwankungen haben zwar den Vorteil, dass man bei der Funktionsanalyse mit unterschiedlichen Expressionsniveaus arbeiten kann, was in manchen Fällen durchaus erwünscht ist. Es besteht aber auch die Gefahr, dass das Expressionsniveau für derartige Analysen oft zu schwach sein kann. So führen beispielsweise

die Kreuzungen der Aktivatoren mit dem *Xefl $\alpha$* -Promotor gegen den NIC-Effektor zu keinen erkennbaren Effekten, obwohl man das aufgrund des *gal4*-Expressionsmusters und der vermuteten Funktionen von aktiviertem Notch erwarten würde. Offensichtlich ist bei diesen Aktivatoren das Gal4-Expressionsniveau zu schwach, so dass in Nachkommen aus Kreuzungen dieser Aktivatoren mit dem NIC-Effektor kein ausreichendes Expressionsniveau an aktiviertem Notch erreicht wird. Ähnliche Beobachtungen werden auch bei anderen Kreuzungen gemacht. So führen beispielsweise nur Kreuzungen des deltaD-Aktivators mit der Insertion Nr.58 gegen den NIC-Effektor mit der Insertion Nr.5 zu starken phänotypischen Effekten. Kreuzungen desselben Aktivators gegen Effektoren mit anderen Insertionen des gleichen Konstruktes zeigen hingegen deutlich abgeschwächte Phänotypen (Kapitel 3.7.2). So lassen sich z.B. bei Nachkommen aus Kreuzungen gegen den NIC-Effektor mit der Insertion Nr.19 keine Auswirkungen auf die *islet1*-positiven Zellen beobachten (nicht gezeigt). Ein weiterer Hinweis darauf, dass das Expressionsniveau ein limitierender Faktor bei funktionellen Studien mit Hilfe des GAL4-Systems sein kann, wird aus der Tatsache ersichtlich, dass bei Nachkommen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators (Insertion Nr.13) mit dem shh-Effektor (Insertion Nr. 7 oder 36) phänotypische Effekte nur dann erzielt werden, wenn die Embryonen bei relativ hoher Temperatur hitzegeschockt werden (Kapitel 3.7.13). Zwar liegen in diesem Fall die Hitzeschock-Bedingungen noch deutlich unter den kritischen Werten, bei denen der Hitzeschock selbst oder Gal4 die Entwicklung erkennbar stören (Kapitel 3.8). Es ist aber durchaus denkbar, dass in anderen Fällen das erforderliche Expressionsniveau unter geeigneten Bedingungen nicht mehr erreicht wird.

Somit ist festzuhalten, dass das GAL4-System für die Funktionsanalyse von Genen im Zebrafisch eingesetzt werden kann, wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind. Zum einen muß ein Promotor verfügbar sein, der eine relativ starke Expression von Gal4 in transgenen Organismen erlaubt. Dabei scheinen Zebrafisch-Promotoren im allgemeinen besser geeignet zu sein als heterologe Promotoren. Desweiteren sollte es sich um ein Effektorprotein handeln, das auch schon bei verhältnismäßig schwacher Expression funktionelle Studien erlaubt, wie das offensichtlich für aktiviertes Notch der Fall ist. Versuche mit dominant-negativen Molekülen, deren Wirken über eine konzentrations-abhängige Interferenz mit endogenen Proteinen funktioniert, könnten beim derzeitigen Stand der Technik zu Problemen führen. Und schließlich ist es auf jeden Fall sinnvoll, mehrere unabhängige Insertionen mit einem Konstrukt herzustellen, da es erhebliche Unterschiede im Expressionsniveau bei verschiedenen Insertionen mit einem Konstrukt gibt.

## 4.5 Verbesserungsvorschläge für das GAL4-System im Zebrafisch

Wie aus Kapitel 4.4 hervorgeht, sollte ein Ziel zukünftiger Arbeiten mit dem GAL4-System eine Verbesserung der Technik sein, um diese Methode effizienter und zuverlässiger zu machen. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten.

Beispielsweise ist die Verwendung stärkerer Transaktivierungsdomänen möglich. Dabei kann man sich die Tatsache, dass die DNA-Bindung und Transaktivierung durch Gal4 durch zwei separate Proteindomänen erfolgt, zu Nutze machen (Gill und Ptashne, 1987). Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, Aktivatoren mit einem stärkeren Transaktivator herzustellen. In diesem Fall wurde die Transaktivierungsdomäne von Gal4 durch eine des E2A-Proteins aus Maus ersetzt, einem Homolog des *Drosophila* bHLH Proteins Daughterless (Argenton et al., 1996). Es wurde aber festgestellt, dass das daraus entstehende Protein selbst eine sehr hohe Toxizität besitzt und aus diesem Grund nicht als Aktivator geeignet ist (Kapitel 3.8). Andere Transaktivatoren, wie VP16, wurden bisher nicht getestet.

Eine weiterer Ansatz zur Verbesserung des GAL4-Systems besteht in der Modifikation der Effektorstrukturen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur zwei unterschiedliche UAS-Konstrukte getestet (nicht gezeigt). Bei dem einen handelt es sich um ein ursprünglich bei der Etablierung des GAL4-Systems in *Drosophila* verwendetes Konstrukt (Brand und Perrimon, 1993), das ein Fragment des *hsp70*-Promotors aus *Drosophila* als Minimalpromotor enthält. Bei dem anderen handelt es sich um das in dieser Arbeit hergestellte Konstrukt, dessen Minimalpromotor aus einem zusammengesetzten Element des *elb*-Promotors von Adenovirus und des Transkriptionsstartes des Carp  $\beta$ -*actin*-Promotors besteht. Letzteres wurde in anfänglichen transienten Versuchen als geeigneter für den Zebrafisch befunden (nicht gezeigt) und deswegen verwendet. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich noch besser geeignete Effektorstrukturen herstellen lassen.

Eine weitere Möglichkeit der Verbesserung würde in der Einflußnahme auf den Zustand der transgenen DNA am Integrationsort bestehen. Zur Zeit gibt es beim Zebrafisch, anders als bei der Maus, keine Möglichkeit, um Insertionen an vorherbestimmten Stellen des Genoms zu erzeugen. Dafür kann aber Einfluß auf die Kopienzahl genommen werden. Arbeiten in Maus haben gezeigt, dass konkatemere Mehrfachinsertionen schwächer exprimiert werden als Einfachinsertionen (Garrick et al., 1998). Es wird vermutet, dass dafür eine Heterochromatisierung von sich wiederholenden Sequenzen im Genom verantwortlich ist (Garrick et al., 1998; Henikoff, 1998). Durch Mikroinjektion erzeugte transgene Insertionen sind beim Zebrafisch scheinbar ebenfalls meistens konkatemere Mehrfachinsertionen (Stuart



et al., 1990; Caldovic und Hackett, 1995). Falls im Zebrafisch ähnliche Mechanismen wie bei Maus wirken, würde man erwarten, dass Einfachinsertionen stärker exprimiert werden als konkatemere Mehrfachinsertionen. Durch retrovirale oder Transposon-vermittelte Insertionen erzeugte Transgene sind in aller Regel Einfachinsertionen (Lin et al., 1994; Raz und Driever, 1997). Es wird also interessant sein zu sehen, inwieweit die bereits begonnene Koppelung der verschiedenen Techniken mit dem GAL4-System zu einer Verbesserung des letzteren führen. Eine weitere Möglichkeit zur Begrenzung der Kopienzahl besteht in einer Cre/*loxP*-vermittelten Rekombination multimerer Insertionen. Dabei macht man sich die Eigenschaften der aus dem Bakteriophagen P1 stammenden Cre-Rekombinase zu eigen, die zwischen zwei *loxP*-Sequenzen gelegenen DNA-Elemente heraus zu rekombinieren (zur Übersicht: Plück, 1996). Deswegen wurden Konstrukte hergestellt, die eine *loxP*-Sequenz an einem Ende enthalten (nicht gezeigt). Mit diesen Konstrukten wurden transgene Organismen hergestellt, die nun für weitere Analysen zu Verfügung stehen. Falls diese Insertionen konkatemere Mehrfachinsertionen darstellen, sollte durch die Expression der Cre-Rekombinase (z.B. durch mRNA-Injektion) eine Rekombination erfolgen, durch die die Insertion auf einige wenige Kopien (im Idealfall eine einzige Kopie) des Transgens reduziert wird. Ob diese Experimente einen positiven Einfluß auf die Expression des Transgens haben werden, wird Gegenstand weiterer Analysen sein.

Schließlich besteht auch die Möglichkeit, sich die transaktivierende Eigenschaft von Gal4 für eine stärkere Expression des selben zu Nutze zu machen. Aus diesem Grund wurde ein Konstrukt hergestellt, bei dem die kodierende Sequenz von Gal4 unter der Kontrolle von UAS-Sequenzen steht (nicht gezeigt). Dieses Konstrukt wurde bereits in Zebrafisch-Eier injiziert und die adulten Fische stehen zur Sichtung zur Verfügung. Bei Kreuzungen eines Aktivators mit einem für dieses Konstrukt transgenen Fisches könnte es zu einer Amplifikation der Gal4-Expression in der Nachkommenschaft kommen. Kreuzt man zusätzlich eine Insertion mit einem Effektorgen unter Kontrolle von UAS-Sequenzen ein, so würde auch dessen Expression verstärkt. Ob eine solche „Verstärkerlinie“ tatsächlich zu einer Verbesserung des GAL4-Systems beitragen kann, werden weiterführende Analysen zeigen. Bei allen Versuchen zur stärkeren Expression von Gal4 ist eine natürliche Grenze in jedem Fall dadurch gegeben, dass dieses Protein ab einem gewissen Expressionsniveau selbst toxische Effekte hat (Kapitel 3.8). Dieses Expressionsniveau ist aber offensichtlich sehr hoch.

## **4.6 Aktiviertes Notch unterdrückt die Ausprägung von neuronalem Zellschicksal bei neuralen Vorläuferzellen des Neuralrohrs und der Retina**

Die schon von anderen Gruppen beschriebene Unterdrückung der Expression neuronaler Marker in Zellen des Neuralrohrs und der Retina durch aktiviertes Notch (Coffman et al., 1990; Henrique et al., 1995; Chitnis et al., 1995; Dorsky et al., 1995; Tomita et al., 1996; Henrique et al., 1997; Appel et al., 1998; Takke et al., 1999; Furukawa et al., 2000; Morrison et al., 2000; Gaiano et al., 2000) konnte auch unter Verwendung des GAL4-Systems im Zebrafisch bestätigt werden. Dabei wurde eine relativ umfassende Analyse mit einer Vielzahl unterschiedlicher neuronaler Marker an verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt. Die Analysen früherer Arbeiten, die sich zumindest im Neuralrohr auf einzelne Zelltypen junger Stadien beschränkt haben, wurden durch die vorliegenden Studien somit wesentlich erweitert. Dies wurde durch die besonderen Vorteile des GAL4-Systems möglich. So sind Funktionsanalysen an späteren Stadien durch mRNA-Injektion von aktiviertem Notch kaum durchführbar, da die verursachte ubiquitäre Expression des Proteins bereits in frühen Stadien zu starken morphologischen Abnormalitäten führt (Coffman et al., 1993; Kapitel 3.7.2 dieser Arbeit). Beispielsweise unterdrückt die frühe Expression von aktiviertem Notch die Ausbildung der Augen, so dass Zellschicksalsentscheidungen in diesem Organ nicht untersucht werden können. Auch die Untersuchungen der Funktion von aktiviertem Notch bei Zellschicksalsentscheidungen im Neuralrohr durch mRNA-Injektion sind mit einem Problem behaftet. Dies besteht darin, dass aktiviertes Notch einen starken Effekt auf die Ausbildung des Notochords hat (Coffman et al., 1993; Appel et al., 1998; Kapitel 3.7.11 dieser Arbeit). Dem Notochord seinerseits wird aber eine bedeutende Funktion bei der Polarisierung des Neuralrohrs und somit bei der Entstehung von Zelldiversität in diesem Organ beigemessen. Aus diesem Grund ist die Unterscheidung von Defekten, die auf den direkten Einfluß von aktiviertem Notch bei einer Zellschicksalsentscheidung zurückzuführen sind und solchen, die indirekt durch Notochord-Defekte hervorgerufen werden, mitunter nicht möglich. Derartige Probleme konnten bei der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Aktivatoren umgangen werden.

Der *deltaD*-Aktivator erlaubt eine gezielte Missexpression eines Effektorgens in einzelnen Zellen des Neuralrohrs und der Retina. Die *gal4*-Expression des verwendeten Aktivators gleicht zumindest bei grober Betrachtung der Expression des endogenen *deltaD* sehr stark. Für *deltaD* wie auch einige andere *delta*-Homologe wurde beschrieben, dass es im Laufe der Entwicklung verstärkt in solchen Zellen der Neuralplatte und des Neuralrohrs exprimiert

wird, die im Zuge der lateralen Inhibition als neuronale Vorläuferzellen ausselektiert werden (Dornseifer et al., 1997; Haddon et al., 1998; Appel et al., 1998). Vergleichbare Expressionseigenschaften verschiedener *delta*-Homologe wurden auch bei anderen Organismen für die Retina festgestellt (Ahmad et al., 1997; Dorsky et al., 1997; Henrique et al., 1997). Nach der vorherrschenden Meinung bewirkt die verstärkte Expression von Delta in den neuronalen Zellen eine verstärkte Aktivierung von dessen Rezeptor Notch in den umliegenden Zellen, was letztere zur Ausprägung eines von den Delta-exprimierenden Zellen abweichenden Schicksals führt (siehe zum Beispiel: Heitzler und Simpson, 1991). Im Falle der Kreuzungen des dID-Aktivators mit dem NIC-Effektor bedeutet dies, dass Zellen, die normalerweise *deltaD* exprimieren, gleichzeitig zur Expression von aktiviertem Notch veranlasst werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen auf das Zellschicksal verschiedener von dieser Expression betroffener Zellen untersucht. Da die Expression durch den verwendeten Aktivator auf einzelne Zellen beschränkt bleibt, zeigen die davon betroffenen Embryonen keine starken morphologischen Defekte und überleben relativ lange (Kapitel 3.7.2). Dies erlaubt die Untersuchung von Auswirkungen der Expression an relativ späten Stadien.

Der hsp-Aktivator wurde für eine ubiquitäre Expression des Effektorgens verwendet. Der Vorteil gegenüber mRNA-Injektionen besteht in der Induzierbarkeit der Expression. Somit kann zum Beispiel die Expression von aktiviertem Notch in der Retina erst angeschaltet werden, nachdem sich das Auge gebildet hat. Dadurch werden Untersuchungen von Zellschicksalsentscheidungen in diesem Organ trotz ubiquitärer Expression erst möglich.

Die Versuche der Expression von aktiviertem Notch mit beiden Aktivatoren führt zu einer verminderten Ausprägung von neuronalem Zellschicksal mit allen untersuchten Markern und bei allen getesteten Stadien im Neuralrohr und in der Retina (Kapitel 3.7.4 und 3.7.7). Dabei wurden eine Reihe verschiedener Marker verwendet, mit der sich eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen detektieren lassen.

Die Untersuchungen für das Neuralrohr wurden hauptsächlich mit dem dID-Aktivator durchgeführt. Dabei konnte mit verschiedenen Markern und an unterschiedlichen Stadien eine Reduktion aller getesteter Klassen neuronaler Zelltypen festgestellt werden (Kapitel 3.7.4). Sowohl Motorneurone, Interneurone wie auch sensorische Neurone sind in ihrer Anzahl im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Auch mit Markern, die viele unterschiedliche neuronale Zelltypen färben, wurde bei allen getesteten Stadien eine Reduktion dieser Zellen festgestellt. Dies ist besonders für späte Stadien interessant, da in früheren Arbeiten vermutet wurde, dass der Verlust früher neuronaler Zelltypen eine verzögerte Differenzierung

widerspiegelt (Appel et al., 1998). Nach dieser Auffassung wird die verminderte Ausprägung früher neuronaler Zellschicksale durch eine verstärkte Ausprägung späterer neuronaler Schicksale kompensiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen an bis zu drei Tage alten Larven (sechs Tage nach der Befruchtung) gemacht und auch in diesem Fall wurde bei allen Tests eine Reduktion neuronaler Zellen festgestellt. Offensichtlich führt bis zu den untersuchten Stadien die Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des dID-Aktivators nicht zu einer Überausprägung später neuronaler Zelltypen auf Kosten von früheren.

Auch die Experimente, die bisher mit dem hsp-Aktivator durchgeführt wurden, führen zu einer Reduktion der Expression neuronaler Marker in der Neuralplatte. Bei mit 70 % Epibolie hitzegeschockten Embryonen kann im 1 Somiten-Stadium eine starke Reduktion der *neurogenin1*-positiven Zellen und bei 8 Somiten eine nahezu vollständige Reduktion der *islet1*-positiven Zellen beobachtet werden (Kapitel 3.7.4).

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Untersuchung der Retina gemacht. Die Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des dID-Aktivators führt zu einer Reduktion der Ganglionzellen, Amakrinzellen, Stäbchen und Zapfen bei drei Tage alten Embryonen und zwei Tage alten Larven (Kapitel 3.7.7). Für die übrigen beiden neuronalen Zelltypen der Retina (Bipolar- und Horizontalzellen) standen keine geeigneten Marker zur Verfügung. Wie auch im Neuralrohr, so wurde durch die Expression von aktiviertem Notch in der Retina keine absolute Unterdrückung von neuronalem Zellschicksal erreicht, sondern immer nur eine Reduktion beobachtet. Dafür kann es zwei mögliche Gründe geben. Zum einen ist es denkbar, dass DeltaD nicht an der Spezifizierung aller Neurone beteiligt ist. Da es eine Reihe anderer Delta-Homologe im Zebrafisch gibt und auch andere Liganden des Rezeptors Notch beschrieben sind, könnte es sein, dass diese die Spezifizierung anderer Neurone regulieren. Ein anderer Grund könnte in der Durchlässigkeit der Methode liegen. So zeigen z.B. Embryonen aus Kreuzungen von Organismen mit unterschiedlichen Insertionen des UAS-mycNIC-Konstruktes mit dem selben dID-Aktivator unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen (Kapitel 3.7.2), auch im Hinblick auf die Reduktion neuronaler Zellen (Kapitel 4.4). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass die bei dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Insertionen nicht den stärksten Effekt verursachen, der mit den verwendeten Konstrukten theoretisch denkbar wäre.

Die Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des hsp-Aktivators führt zu einer stärkeren Verminderung von neuronalen Zellen in der Retina (Kapitel 3.7.7). Bei mit 27 Stunden hitzegeschockten Embryonen, also zu dem Zeitpunkt wo die ersten Ganglionzellen postmitotisch werden (Hu und Easter, 1999), sind mit drei Tagen so gut wie keine Ganglion-

zellen, Amakrinzellen und Zapfen zu beobachten. Die normalerweise später entstehenden Amakrinzellen (ab 38 Stunden) und Zapfen (ab 48 Stunden) werden entweder auf Grund der Persistenz des Effektorproteins (Kapitel 3.7.3) nicht gebildet, oder weil sie die normalerweise früher entstehenden Zellen der Retina für ihre Differenzierung benötigen. Hitzeschocks bei 35 Stunden führen zur Ausprägung einiger 16A11-positiver Zellen in der Ganglionzellschicht, während sich nur wenige neuronale Zellen in der inneren nukleären Schicht und der Photorezeptorzellschicht nachweisen lassen. Hitzeschocks bei 48 Stunden führen zu einer Vielzahl von 16A11-positiven Zellen in der Ganglionzellschicht und inneren nukleären Schicht, während sich fast keine ausdifferenzierten Stäbchen und Zapfen bilden. Während alle bisher beschriebenen Hitzeschocks, wie auch die Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des dID-Aktivators, zu starken Defekten der Schichtung im zentralen Bereich der Retina führen, lassen Hitzeschocks, die bei drei Tage alten Embryonen durchgeführt wurden, nur noch Defekte in peripheren Bereichen der dorsalen Retina bei drei Tage alten Larven erkennen (Kapitel 3.7.6). Die Schichtung und auch die Morphologie der verschiedenen Zelltypen im zentralen Bereich der Retina erscheint normal. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass Zellen, die sich bereits differenziert haben, durch die Expression von aktiviertem Notch zumindest nicht im großen Maßstab eine Zellschicksalsänderung erfahren. Dies widerspricht der von Anderen geäußerten Hypothese, dass aktiviertes Notch auch auf das Schicksal solcher Zellen einen Einfluß hat (Ahmad et al., 1995). Andererseits zeigen diese Resultate, dass aktiviertes Notch die Ausbildung jedes untersuchten neuronalen Zellschicksals in der Retina individuell unterdrücken kann. Sowohl Ganglionzellen, Amakrinzellen, Stäbchen und Zapfen sind während ihrer Entstehung sensitiv für das inhibierende Signal.

#### **4.7 Aktiviertes Notch fördert die Ausprägung von glialem Zellschicksal bei neuronalen Vorläuferzellen des Neuralrohrs und der Retina**

Eine Frage, die sich unmittelbar aus der beobachteten Unterdrückung von neuronalem Zellschicksal im Neuralrohr und der Retina durch aktiviertes Notch ergibt ist, welches Schicksal die betroffenen Zellen annehmen. Diese Frage wurde bei Studien verschiedener Arbeitsgruppen unterschiedlich beantwortet. Während in manchen Studien aus *Xenopus*, Hühnchen, Zebrafisch und Maus berichtet wurde, dass die Aktivierung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges in der Retina und dem Neuralrohr Zellen in einem undifferenzierten Zustand hält (Coffman et al., 1990; Henrique et al., 1995; Chitnis et al.,

1995; Dorsky et al., 1995; Tomita et al., 1996; Henrique et al., 1997; Appel et al., 1998), deuten die Ergebnisse anderer Gruppen darauf hin, dass aktiviertes Notch neurale Vorläuferzellen in ein gliales Zellschicksal führt (Furukawa et al., 2000; Morrison et al., 2000; Gaiano et al., 2000). Diese Unterschiede wurden durch die Verwendung unterschiedlicher Konstrukte bzw. subtile Unterschiede im Expressionsniveau bei verschiedenen Studien oder durch Art-bedingte Unterschiede erklärt (Furukawa et al., 2000). So stammen beispielsweise die Ergebnisse, die eine glialisierende Funktion von aktiviertem Notch nahelegen ausschließlich aus Maus (Gaiano et al., 2000), Ratte (Furukawa et al., 2000) oder kultivierten Rattenzellen (Morrison et al., 2000). Es ist also durchaus denkbar, dass aktiviertes Notch tatsächlich unterschiedliche Einflüsse auf das Schicksal neuraler Vorläuferzellen in verschiedenen Organismen hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass aktiviertes Notch beim Zebrafisch die Ausprägung von glialem Zellschicksal im Neuralrohr und in der Retina fördert (Kapitel 3.7.5 und 3.7.8). Diese Beobachtung schließt die Möglichkeit von Art-bedingten Unterschieden der Funktion von aktiviertem Notch nicht aus. Es erscheint allerdings als unwahrscheinlich, dass die funktionellen Übereinstimmungen bei Nagern und Fischen unabhängig voneinander entstanden sind. Die bei verschiedenen Wirbeltieren nahezu identische Strukturierung der Retina (Muller, 1857; Cajal, 1893) und die Ähnlichkeit bei deren Entstehung legen eine gewisse Konservierung der zugrunde liegenden molekularen Prozesse nahe.

Eine andere Möglichkeit für die unterschiedlichen Beobachtungen bei verschiedenen Studien könnte in methodischen Abweichungen bestehen. Ein offensichtlicher Unterschied bei den Versuchen dieser Arbeit im Vergleich zu Studien anderer Gruppen besteht in der Tatsache, dass aufgrund der Technik und durch die verwendeten Promotoren eine regulierte Expression des Effektorgens erreicht wurde. Es ist zu erwarten, dass sowohl bei Versuchen mit dem dID- wie auch mit dem hsp-Aktivator die Expression des Effektorgens mit der Zeit abgeschaltet wird und das somit auch das Effektorprotein aus den Zellen verschwindet. Im Gegensatz dazu führen die Lipofektionsexperimente bei *Xenopus* und die retrovirale Infektion bei Hühnchen, Maus und Ratte zu einer kontinuierlichen Expression des Effektorgens. Es wäre somit denkbar, dass aktiviertes Notch Zellen an der Differenzierung hindert und das diese Zellen das gliale Schicksal erst annehmen, wenn kein Effektorprotein mehr in den Zellen vorhanden ist. Um dies zu überprüfen wurde die Tatsache ausgenutzt, dass bei der Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des hsp-Aktivators das Effektorprotein noch sehr lange nach dem Hitzeschock in der Retina exprimiert wird (Kapitel 3.7.3). Die Experimente lassen vermuten, dass sich die gleichzeitige Expression von aktiviertem Notch und die Ausprägung des glialen

Schicksals in der Retina nicht ausschließen (Kapitel 3.7.9). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Gruppen die zeigen, dass aktiviertes Notch in Zellen, die das gliale Schicksal bereits angenommen haben, weiter exprimiert wird (Furukawa et al., 2000; Gaiano et al., 2000). Ein direkter Nachweis dieser Tatsache wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht erbracht, da keine geeigneten Marker zur Verfügung standen, die die gleichzeitige Expression von aktiviertem Notch und die Ausprägung des glialen Schicksals erkennbar machen könnten.

Die von Furukawa et al. vorgeschlagene Möglichkeit, dass die abweichenden Ergebnisse auf die Verwendung unterschiedlicher Konstrukte oder subtile Unterschiede im Expressionsniveau bei verschiedenen Studien zurückzuführen sein könnten, kann anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden (Furukawa et al., 2000). Zusätzlich sind aber auch noch andere Erklärungen denkbar.

Zum einen ist die Interpretation der erzielten Ergebnisse von der erreichten Auflösung abhängig und kann somit bei verschiedenen Studien unterschiedlich ausfallen. So führten Studien aus einer Arbeitsgruppe zu dem Ergebnis, dass aktiviertes Notch die Ausprägung neuronaler Zellen in der Retina unterdrückt und die Bildung eines nicht identifizierbaren Zelltyps fördert (Bao und Cepko, 1997), während die gleiche Arbeitsgruppe einige Zeit später in der Lage war, die entstandenen Zellen als Gliazellen zu identifizieren (Furukawa et al., 2000). Die Klassifizierung undifferenzierter Zellen in der Retina wurde ausschließlich anhand der Zellmorphologie vorgenommen (Dorsky et al., 1995; Tomita et al., 1996; Henrique et al., 1997). Ein Bewertungskriterium, welches für die Unterscheidung undifferenzierter Zellen von Müllerschen Gliazellen verwendet wurde, ist z.B. die Lage des Zellkörpers. Während Müllersche Gliazellen ihren Zellkörper in der inneren nukleären Schicht haben, soll sich der von undifferenzierten Zellen in weiter äußeren Schichten befinden (Dorsky et al., 1995). Die Studien von Furukawa et al. haben aber gezeigt, dass Zellen, die positiv für verschiedene gliale Marker sind und in denen aktiviertes Notch exprimiert wurde, ihre Zellkörper nicht nur in der inneren nukleären Schicht, sondern zum Teil auch in der Schicht der Photorezeptoren haben (Furukawa et al., 2000). Dies ist genau die Position, die bei anderen Arbeiten undifferenzierten Zellen zugeschrieben wird. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die Expression von aktiviertem Notch unter Kontrolle des *deltaD*- und *hsp70*-Promotors zu einer Disorganisation der retinalen Schichtung führt (Kapitel 3.7.6). Es ist also anzunehmen, dass die Lage des Zellkörpers der Gliazellen in den Mutanten wesentlich variabler ist als im Wildtyp. Da der verwendete Antikörper zur Identifikation der Gliazellen

aber nur die Fortsätze der Zellen färbt, ist eine genaue Beschreibung der Lage des Zellkörpers anhand der vorliegenden Daten nicht möglich.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse bei verschiedenen Studien besteht in der Möglichkeit, dass sich die Bedeutung von aktiviertem Notch bei Zellschicksalentscheidungen im Neuralrohr und in der Retina nicht auf eine einzige Funktion reduzieren lässt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten in der Tat darauf hin, dass nicht alle retinalen Zellen, in denen aktiviertes Notch exprimiert wird, ein gliales Schicksal annehmen. Dies wird besonders deutlich bei der Expression des Effektorproteins mit Hilfe des hsp-Aktivators. Hitzeschocks bei 27 und 35 Stunden führen bei drei Tage alten Embryonen beispielsweise dazu, dass Zellen im zentralen Bereich der Retina verstärkt den glialen Marker *zrf1* exprimieren (Kapitel 3.7.8). Im peripheren Bereich der Retina geschieht dies allerdings nicht. In dieser Region befinden sich beim Wildtyp undifferenzierte Zellen, die für das weitere Wachstum der Retina während späterer Entwicklungsstadien verantwortlich sind. Diese Zellen sind offensichtlich nicht in der Lage, auf die Expression von aktiviertem Notch durch die Ausprägung des glialen Schicksals zu reagieren. Es könnte also sein, dass Zellen, die keine – von Notch unabhängigen – Signale zur Differenzierung erhalten haben, die Expression von aktiviertem Notch nicht als Differenzierungssignal interpretieren. Inwieweit diese Aussage von grundsätzlicher Natur ist oder sich nur auf die Zellen der marginalen Zone der Retina beschränkt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Weiterhin fällt auf, dass bei mit 27 Stunden hitzegeschockten Embryonen scheinbar nicht alle Zellen im zentralen Bereich der Retina das gliale Schicksal annehmen (Kapitel 3.7.8). Da die Zellen aber auch keinen der getesteten neuronalen Marker exprimieren (Kapitel 3.7.7) besteht die Möglichkeit, dass es sich bei ihnen um undifferenzierte Zellen handelt. Bei mit 48 Stunden durchgeführten Hitzeschocks nehmen mit drei Tagen nur relativ wenige Zellen im peripheren Bereich der Retina ein gliales Schicksal an. Bei der Betrachtung der Schicht der Photorezeptoren fällt auf, dass es in diesem Bereich kolumnar angeordnete Zellen gibt, bei denen es sich nicht um Gliazellen handelt, die aber auch keinen der getesteten neuronalen Marker exprimieren. Das Schicksal dieser Zellen ist unbekannt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aktiviertes Notch einen Teil der neuronalen Vorläuferzellen des Neuralrohrs und der Retina in ein gliales Schicksal führt. Über die zellulären Voraussetzungen für die glialisierende Eigenschaft von Notch kann zur Zeit nur spekuliert werden (Kapitel 4.9).



## 4.8 Der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg und der Zellzyklus

Eine Verbindung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges mit dem Zellzyklus wird durch verschiedene Studien nahegelegt (zur Übersicht: Ohnuma et al., 1999), aber die genauen Regulationsmechanismen sind weiterhin unklar. Die von manchen anderen Gruppen gemachte Beobachtung, dass die Aktivierung von Notch zu einer verstärkten Proliferation der betroffenen Zellen führt (Ishibashi et al., 1995; Henrique et al., 1997; Furukawa et al., 2000), konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Kapitel 3.7.10). Tatsächlich führt die Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des dID- oder hsp-Aktivators zu einer Verminderung der Teilungsaktivität in der Retina. Für das Neuralrohr sind die Auswertungen diesbezüglich nicht abgeschlossen, aber die vorläufigen Daten sprechen ebenfalls nicht für eine erhöhte Teilungsaktivität. Die Gründe für diese Abweichungen sind unklar, könnten aber auf ähnliche Weise erklärt werden, wie die beobachteten Unterschiede bei der Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch auf das Schicksal der betroffenen Zellen (Kapitel 4.7). Interessanterweise zeigen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Auswirkungen der Expression von aktiviertem Notch in der Retina erstaunliche Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen der Missexpression von  $p27^{Xic1}$  bei *Xenopus* (Ohnuma et al., 1999). Die Missexpression dieses Mitglieds der Cip/Kip-Familie der Cdk(cyclin-dependent kinase)-Inhibitoren führt ebenfalls zu einer vorzeitigen Differenzierung von Gliazellen in der Retina und zu einer Unterdrückung von zumindest einem neuronalem Zelltyp (Bipolarzellen). Entsprechend seiner Funktion als Cdk-Inhibitor verursacht  $p27^{Xic1}$  eine Arretierung des Zellzyklus und verhindert somit die weitere Teilung der betroffenen Zellen. Dabei ist die Arretierung des Zellzyklus alleine nicht ausreichend, um Zellen in ein gliales Schicksal zu führen, sondern  $p27^{Xic1}$  ist für diesen Vorgang notwendig. Die glialisierende Eigenschaft des Cdk-Inhibitors wird dabei durch die gleichzeitige Expression von aktiviertem Notch verstärkt, aber von einem vergleichbaren Effekt durch die alleinige Expression von aktiviertem Notch wurde in diesen Studien nicht berichtet. Die Autoren spekulieren, dass die Funktion von  $p27^{Xic1}$  bei der Förderung des glialen Schicksals in der Retina mit dem Delta/Notch-Signaltransduktionsweg verknüpft ist. Diese Vermutung wird durch die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen unterstützt. Über die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen geben die vorliegenden Daten allerdings keinen Aufschluß. Ob z.B. der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg die Expression von  $p27^{Xic1}$  reguliert oder umgekehrt, oder ob beide Wege völlig unabhängig arbeiten, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die Expression von aktiviertem Notch fördert die Bildung radialer Gliazellen im Vorderhirn von Mäusen (Gaiano et al., 2000). Viele der betroffenen Zellen werden postnatal zu periventrikularen Astrozyten, welche vor kurzem als neurale Stammzellen von adulten Tieren beschrieben wurden (Doetsch et al., 1999). Gaiano et al. argumentieren, dass der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg eine grundsätzliche Funktion bei der Bildung von Stammzellen haben könnte (Gaiano et al., 2000). Da eine Eigenschaft von solchen Zellen in deren langsamer – wenn auch fortwährender - Teilungsaktivität besteht, schließt die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die Expression von aktiviertem Notch zu weniger Zellteilungen führt eine solche Möglichkeit nicht aus. Allerdings ist eine klonale Verwandtschaft von Müllerschen Gliazellen und Stammzellen im Auge bisher nicht beschrieben wurden.

#### **4.9 Die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei der Entstehung von Zelldiversität im Neuralrohr und in der Retina**

Aussagen über die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei der Entstehung von Zelldiversität im Neuralrohr und in der Retina in der wildtypischen Situation sind durch die bei der vorliegenden Studie erreichte Auflösungebene begrenzt. Untersuchungen wurden ausschließlich auf der Ebene des Gewebeverbandes, aber nicht an einzelnen identifizierten Zellen vorgenommen. Somit ist die Vorgeschichte einer Zelle, die von ihr bereits empfangenen Differenzierungs- oder Spezifizierungssignale und ihre Position im Zellzyklus bei der Expression von aktiviertem Notch weitgehend unbekannt, wobei davon auszugehen ist, dass diese Faktoren die Schicksalsentscheidung der betroffenen Zelle beeinflussen (Kapitel 4.7 und 4.8). Ein weiteres Hindernis besteht in der Tatsache, dass die Expressionsmuster von Mitgliedern des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges im Neuralrohr und der Retina des Zebrafisches nur relativ grob beschrieben sind (Bierkamp und Campos-Ortega, 1993; Dornseifer et al., 1997; Appel und Eisen, 1998; Haddon et al., 1998; Smithers et al., 2000). Auch hier ist die Auflösung auf zellulärer Ebene nur sehr gering. Außerdem muß in Betracht gezogen werden, dass die vorliegenden Resultate durch die Expression einer veränderten Variante des Transmembranrezeptors Notch erzielt wurden. Inwieweit diese Bedingungen alle Aspekte der Aktivierung des Transduktionsweges durch einen Notch-Liganden wie Delta widerspiegeln, ist unbekannt. Aus diesem Grunde ist es wichtig, die gemachten Beobachtungen durch unabhängige Studien, wie z.B. der Analyse von Mutanten, abzusichern.

Dennoch geben die Ergebnisse dieser Arbeit einige Hinweise auf die Funktion des Delta/Notch -Signaltransduktionsweges bei der Entstehung von Zelldiversität im Neuralrohr und in der Retina. So lassen die gemachten Beobachtungen, wie auch die Resultate einiger anderer Gruppen, ein Modell, wonach die alleinige Funktion von aktiviertem Notch darin besteht Zellen in einem undifferenzierten Zustand zu halten, als unwahrscheinlich erscheinen. Nach diesem Modell wäre Notch nicht direkt an der Ausprägung eines Zellschicksals beteiligt, sondern würde nur eine Gruppe von Zellen zur Verfügung stellen, auf die die eigentlichen Induktoren eines Zellschicksals zum jeweils richtigen Zeitpunkt wirken können (Coffman et al., 1990; Henrique et al., 1995; Chitnis et al., 1995; Dorsky et al., 1995; Tomita et al., 1996; Henrique et al., 1997; Appel et al., 1998). Die vorliegenden Ergebnisse schließen nicht aus, dass diese Funktion tatsächlich einen Aspekt des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges darstellt. Es ist aber auf jeden Fall anzunehmen, dass aktiviertes Notch auf das Schicksal bestimmter Zellen einen direkteren Einfluß hat. Insbesondere die Tatsache, dass viele Zellen der Retina bei der Expression von aktiviertem Notch unter Kontrolle des *deltaD*- und des *hsp70*-Promotors vorzeitig ein gliales Schicksal annehmen, spricht für diese Funktion. Diese Vermutung ist auch in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass sich differenzierende Müllersche Gliazellen in der Retina von Fröschen und Ratten den Rezeptor Notch exprimieren, während das für andere Zellen der Retina nicht der Fall ist (Ohnuma et al., 1999; Furukawa et al., 2000).

Es lassen sich zwei grundsätzliche Möglichkeiten unterscheiden, wie Notch auf die Ausprägung des glialen Schicksals Einfluß nehmen kann, wobei die vorliegenden Daten keine Abwägung zwischen diesen beiden gegensätzlichen Ansätzen erlauben.

Zum einen ist es denkbar, dass Gliazellen bestimmte spezifizierende Signale für ihre Differenzierung benötigen. Aktiviertes Notch könnte ein solches Signal darstellen und hätte in diesem Fall einen instruktiven Einfluß auf die Ausprägung des glialen Schicksals. Dabei ist es sehr unwahrscheinlich, dass Notch das alleinige spezifizierende Signal für die Gliazellentwicklung ist, also eine Art „Master-Regulator“ für dieses Zellschicksal darstellt. Die pleiotrope Bedeutung von Notch bei vielen Prozessen der Wirbeltierentwicklung scheint mit einer solchen Funktion nicht vereinbar zu sein (Kapitel 1.3.3). Außerdem reagieren nicht alle Zellen des Neuralrohrs und der Retina mit der Ausprägung eines glialen Schicksals auf die Expression von aktiviertem Notch (Kapitel 4.7). Es scheinen also auch andere Faktoren für die gliale Entwicklung nötig zu sein.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Gliazellen keine spezifizierenden Signale für ihre Differenzierung benötigen. Das gliale Schicksal würde also angenommen, wenn eine

Zelle keine spezifizierenden Signale empfängt oder verarbeiten kann. Die Funktion von aktiviertem Notch würde in diesem Fall darin bestehen, eine Zelle daran zu hindern, auf spezifizierende (in diesem Fall neuronalisierende) Signale zu reagieren. Aktiviertes Notch hätte in diesem Fall einen permissiven Einfluß bei der Ausprägung des glialen Schicksals. Interessanterweise ist dies genau die Funktion, die aktiviertem Notch von Gruppen zugeschrieben wird, die dieses Protein als einen generellen Inhibitor von Differenzierung ansehen (Henrique et al., 1995; Chitnis et al., 1995; Dorsky et al., 1995; Tomita et al., 1996; Henrique et al., 1997; Appel et al., 1998). Die Abweichung zu den Aussagen dieser Gruppen besteht in diesem Fall also nicht in der eigentlichen Funktion von aktiviertem Notch (Unterdrückung der Reaktion auf ein spezifizierendes Signal), sondern im Verhalten von Zellen auf dieses Signal (Gliazellentwicklung statt undifferenzierter Zustand).

Eine Frage, die sich bei einer permissiven Funktion von aktiviertem Notch ergibt ist, warum Zellen im Fall der Expression des Proteins frühzeitig das gliale Schicksal annehmen. Eine mögliche Erklärung könnte aus der Trennung der Mechanismen, die für die Differenzierung und die Spezifizierung einer Zelle nötig sind, abgeleitet werden. Es ist denkbar, dass es Einflüsse gibt, die einer Zelle signalisieren sich zu differenzieren, ohne dass diese Zelle konkrete Instruktionen erhalten hat, welches Schicksal sie annehmen soll. Einen solchen Einfluß könnten zum Beispiel die Regulatoren des Zellzyklus ausüben. Die marginale Zone der *Xenopus*-Retina kann beispielsweise in verschiedene Zonen eingeteilt werden (Ohnuma et al., 1999). Von peripher nach zentral findet man zunächst proliferative Zellen mit einem Stammzellcharakter, dann proliferierende Zellen die anfangen Inhibitoren des Zellzyklus zu exprimieren, dann Zellen die zusätzlich Differenzierungsgene exprimieren und schließlich eine Zone der Differenzierung. Diese Abfolge läßt es möglich erscheinen, dass Zellen durch das Wirken von Zellzyklus-Regulatoren zunächst ein allgemeines Signal zur Differenzierung erhalten und das die Realisation des jeweiligen Zellschicksals durch spezifizierende Signale nachgeschaltet ist. Wenn dies zutrifft, sowie die Vermutung, dass aktiviertes Notch Zellen tatsächlich daran hindert auf spezifizierende Signale zu reagieren und die Ausprägung des glialen Schicksals keine spezifizierenden Signale erfordert, so würde die Expression von aktiviertem Notch eine zur Differenzierung bereite aber noch nicht spezifizierte Zelle zwangsläufig in das gliale Schicksal führen.

Die beschriebene Hypothese ist aus verschiedenen Gründen sehr attraktiv. Zum einen kann sie erklären, warum scheinbar nicht alle Zellen des Neuralrohrs und der Retina durch die Expression von aktiviertem Notch in ein gliales Schicksal geführt werden. Sowohl Zellen, die sich bereits differenziert haben, wie auch solche, die noch keine Differenzierungssignale

erhalten haben, sollten auf die Expression nicht mit Gliazellentwicklung reagieren. Genau diese Beobachtungen wurden bei der Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des hsp-Aktivators gemacht (Kapitel 3.7.7 und 3.7.8). Weiterhin könnte die durch die Aktivierung von Notch bedingte Unfähigkeit von Zellen auf spezifizierende Signale zu reagieren auch auf viele andere Zellschicksalsentscheidungen übertragen werden. Auch bei anderen Prozessen sind Entscheidungen denkbar, bei denen die Ausprägung eines Schicksals spezifizierende Signale erfordert, die eines anderen aber nicht. Es ließe sich somit die pleiotrope Verwendung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges erklären. Außerdem könnte die unterschiedliche Bedeutung der Aktivität von Notch in einem Organ mit ein und derselben Funktion des Proteins erklärt werden. In der Frosch-Retina wird Notch zum Beispiel einerseits in bestimmten Bereichen der marginalen Zone exprimiert, und zwar in allen möglichen Vorläufern der unterschiedlichen Zelltypen (Ohnuma et al., 1999). Andererseits wird Notch aber auch in sich differenzierenden Müllerschen Gliazellen exprimiert (siehe oben). In jüngeren Stadien wird Notch sogar in der gesamten Retina exprimiert. Es ist also denkbar, dass aktiviertes Notch zunächst alle neuronalen Vorläuferzellen unempfindlich gegenüber spezifizierenden Signalen macht, dass ein Teil dieser Zellen durch das Abschalten der Notch-Expression die Kompetenz erhält auf derartige Signale zu reagieren und das durch die fortwährende Expression in bestimmten Zellen diese in das Schicksal geführt werden, welches keine spezifizierenden Signale erfordert. Differenzierungssignale inklusive des Zellzyklus, Spezifizierungssignale und der Delta/Notch-Signaltransduktionsweg würden in diesem Fall in einer komplexen und bisher nicht verstandenen Weise ineinander greifen. Der in der Literatur häufig verwendete Begriff *Grundzustand* („default state“) zur Charakterisierung eines Schicksals, dass eine Zelle ohne Spezifizierungssignale annimmt, wurde bewußt vermieden, da er nicht immer einheitlich definiert wurde und zu großen Widersprüchen geführt hat.

#### **4.10 Ausblick auf weiterführende Analysen unter Verwendung der hergestellten transgenen Linien**

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Linien können für eine Reihe von weiterführenden Analysen verwendet werden. Dabei kann man sich die speziellen Vorzüge des GAL4-Systems gegenüber anderen Misexpressionstechniken zu eigen machen.

Die Expression von aktiviertem Notch mit Hilfe des dID- und hsp-Aktivators führen zu einer Reihe phänotypischer Effekte (Kapitel 3.7.11), die nicht weiter analysiert wurden. Embryonen aus Kreuzungen des hsp-Aktivators mit dem NIC-Effektor zeigten in Abhängigkeit des Hitzeschock-Zeitpunktes unter anderem Defekte in der Entwicklung des Notochords, der Somiten, der Neuromasten und viele andere Abnormalitäten. Die Expression des gleichen Effektorgens unter Kontrolle des *deltaD*-Promotors offenbarte unter anderem Otolithen-Defekte, eine stärkere Pigmentierung der betroffenen Organismen und eine Zunahme der Körperlänge. Die genaueren Analysen dieser Beobachtungen können dazu beitragen, die Bedeutung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges bei verschiedenen Prozessen der Wirbeltierentwicklung aufzuklären. Auch bei der näher untersuchten Funktion von aktiviertem Notch bei Zellschicksalsentscheidungen im Neuralrohr und in der Retina bleiben einige Fragen offen, deren Lösung durch weitere Analysen der verwendeten Linien unterstützt werden kann. Beispielsweise ist die Verbindung des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges mit dem Zellzyklus weiterhin unklar. Es wurde auch nicht genauer untersucht, welche Zellen durch die Expression von aktiviertem Notch in ein gliales Schicksal geführt werden. Die Analyse des Einflusses der Expression von aktiviertem Notch auf Zellschicksalsentscheidungen in der marginalen Zone älterer Stadien wurde bisher nicht konsequent durchgeführt. Und es stellt sich nach wie vor die Frage, auf welche Art und Weise aktiviertes Notch zu einer Glialisierung von Zellen des Neuralrohrs und der Retina beiträgt.

Kreuzungen des UAS-her4 Effektors (Insertion Nr.56) mit dem hsp-Aktivator führen bei Hitzeschocks an unterschiedlichen Stadien zu starken phänotypischen Effekten bei den Nachkommen, die offensichtlich auf die Missexpression des Effektorgens zurückzuführen sind (Kapitel 3.7.12). Zu diesen Effekten gehört die Auflösung der klaren somitischen Grenzen in verschiedenen Bereichen des Rumpfes. Eine Auswirkung der Missexpression von *her4* auf die Somitogenese wurde bereits durch mRNA-Injektionen festgestellt (Takke und Campos-Ortega, 1999). Da *her4* während der Somitogenese in verschiedenen Zellen des prä-somitischen Mesoderms nahe des letzten sich bildenden Somiten exprimiert wird (Takke et al., 1999), ist eine Funktion dieses Gens bei der Somitenbildung des Wildtyps sehr wahrscheinlich. Eine detailliertere Analyse der somitischen Defekte von zu unterschiedlichen Zeitpunkten hitzegeschockten Embryonen kann zu einem genaueren Verständnis der Funktion von *her4* während der Somitogenese führen. Aber auch die Bedeutung dieses Gens bei anderen Entwicklungsprozessen kann analysiert werden. Da *her4* als ein dem Rezeptor Notch nachgeschaltetes Gen beschrieben wurde (Takke et al., 1999), wird es interessant sein zu sehen, ob durch die Missexpression von *her4* im Neuralrohr und in der Retina ähnliche

Effekte zu erzielen sind, wie durch die Expression von aktiviertem Notch. Da der *her4*-Effektor erst seit kurzer Zeit verfügbar ist, wurden die entsprechenden Analysen mit diesem Effektor aus zeitlichen Gründen bisher nicht durchgeführt.

Im Laufe dieser Arbeit wurden auch zwei UAS-*sonic hedgehog* Insertionen (Nr.7 und 36) gefunden, die für Funktionsanalysen geeignet sind. Die durch die Missexpression mit Hilfe des *hsp*-Aktivators erzielten Ergebnisse gleichen den ersten durch mRNA-Injektion erzielten Resultaten sehr genau (Kapitel 3.7.13; Ekker et al., 1995). Effekte auf die Somitogenese wurden bisher nicht festgestellt, obwohl diese bei anderen Gruppen durch mRNA-Injektionen von *shh* beschrieben wurden (Weinberg et al., 1996; Kos et al., 1998). Dies mag am Zeitpunkt der bisher durchgeführten Hitzeschocks oder am Expressionsniveau liegen. Überraschenderweise wurden auch keine Auswirkungen der Missexpression von Shh auf die Bildung der *islet1*-positiven Zellen beobachtet (Kapitel 3.7.13). Auch dies hätte man aufgrund der vermuteten Funktion von Shh bei der Polarisation des Neuralrohrs erwartet. Hier könnten ebenfalls der Expressionszeitpunkt und das Expressionsniveau ausschlaggebend sein. Es ist aber auch denkbar, dass andere Faktoren, wie das nodal-ähnliche Protein Cyclops, das bei der Shh-abhängigen Spezifizierung von Motoneuronen notwendig ist (Odenthal et al., 2000), bei diesen Experimenten limitierend wirken. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass bisher keine Ergebnisse beschrieben sind, in denen die Missexpression von Shh *in vivo* zu einer Veränderung in der Zahl oder der Organisation der *islet1*-positiven Zellen führt. Ein weiterer möglicher Grund für die normale Organisation der *islet1*-positiven Zellen bei der Missexpression von Shh könnte in den antagonistischen Eigenschaften der funktionellen Gegenspieler von Shh bei der Polarisierung des Neuralrohrs liegen (Kapitel 1.4). Es wird somit interessant sein zu sehen, ob die gleichzeitige Missexpression von Shh und anderen Faktoren oder die Missexpression von Shh vor dem Hintergrund bestimmter Mutationen, wie z.B. bei Mitgliedern der TGF- $\beta$  Superfamilie, einen Einfluß auf die Entstehung bestimmter Zelltypen im Nervensystem hat. Entsprechende Arbeiten sind derzeit in der Vorbereitung. Ein Nachteil der *shh*-Effektoren besteht in der Tatsache, dass die Hitzeschocks die zur Erzeugung des beschriebenen Phänotyps notwendig sind bereits an der Grenze der Schwelle liegen, wo Gal4 selbst toxische Auswirkungen hat (Kapitel 3.8). Das Expressionsniveau ist also nicht mehr weiter zu steigern. Inwieweit diese Effektoren dennoch für weiterführende funktionelle Studien verwendet werden können, ist Gegenstand momentaner Untersuchungen.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfassende Untersuchungen zur Etablierung des GAL4-Systems im Zebrafisch durchgeführt. Durch die Verwendung von insgesamt acht unterschiedlichen Aktivator- und fünf Effektorstrukturen und durch die Herstellung und Analyse von fast 70 unabhängigen stabilen transgenen Insertionen kann eine relativ genaue Abschätzung über die Möglichkeiten und Grenzen des GAL4-Systems vorgenommen werden. Es konnte gezeigt werden, dass einige wesentliche Voraussetzungen für die Funktionalität der Methode beim Zebrafisch erfüllt sind. So ist es möglich, stabile transgene Insertionen mit voraussagbarer und reproduzierbarer Expression herzustellen. Dadurch können gezielte Experimente unter Verwendung des GAL4-Systems durchgeführt werden. Weiterhin können stabile Insertionen mit von Gal4 transaktivierbaren Effektorgenen erzeugt werden. Damit ist die wesentliche Voraussetzung zur Herstellung von Effektorlinien erfüllt. Außerdem wurde gezeigt, dass Gal4 nur bei sehr starker Expression nachweisbare toxische Effekte erzeugt und das unter Verwendung geeigneter Effektoren phänotypische Studien bei einem deutlich niedrigerem Expressionsniveau von Gal4 möglich sind. Dennoch ist das niedrige Expressionsniveau von Gal4 bei vielen Aktivatoren, bzw. die schwache Transaktivierung der Effektorgene bei vielen Effektoren, das größte Hindernis für eine zuverlässigere und effizientere Nutzung des GAL4-Systems beim derzeitigen Stand der Technik. Es wurden verschiedene Möglichkeiten vorgestellt, wie dieses Problem durch zukünftige Arbeiten gelöst werden könnte.

Die bisher mit dem GAL4-System durchgeführten funktionellen Studien beschränken sich hauptsächlich auf die Expression von aktiviertem Notch1a unter der Kontrolle des *deltaD*- und *hsp70*-Promotors. Dabei wurden die Auswirkungen der Expression auf Zellschicksalsentscheidungen im Neuralrohr und in der Retina genauer untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen vieler anderer Arbeiten wurde festgestellt, dass aktiviertes Notch neurale Vorläuferzellen an der Ausprägung des neuronalen Schicksals hindert. Es konnte auch gezeigt werden, dass viele dieser Zellen ein gliales Schicksal annehmen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Resultaten mancher früherer Studien, die als einzige Funktion von aktiviertem Notch die Unterdrückung jeglicher Differenzierung beschrieben haben. Durch die vorliegende Arbeit wurde die glialisierende Eigenschaft von aktiviertem Notch, die erst vor kurzem im Vorderhirn von Mäusen und in der Retina von Ratten festgestellt wurde, auch für verschiedene neurogene Regionen des Zebrafisches bestätigt. Es handelt sich dabei also nicht um eine auf Nager beschränkte Eigenschaft, sondern um eine von allgemeinerer Bedeutung.



Insbesondere die Tatsache, dass viele Zellen der Retina durch die Expression von aktiviertem Notch frühzeitig in ein gliales Schicksal geführt werden, spricht für eine instruktivere Funktion von Notch als lange Zeit angenommen. Weiterhin wurde - soweit dies möglich ist - versucht, die Funktion des Delta/Notch-Signaltransduktionsweges in den wildtypischen Kontext zu stellen und eine mögliche Verbindung mit dem Zellzyklus wurde diskutiert.

Es wurde festgestellt, dass die Expression von aktiviertem Notch zu einer Vielzahl weiterer Effekte führt, die aus zeitlichen Gründen nicht näher analysiert wurden. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten transgenen Insertionen stellen somit auch ein Ausgangsmaterial für weiterführende Untersuchungen dar.

Dies gilt auch für verschiedene Insertionen mit den beiden Effektorstrukturen UAS-her4 und UAS-sonic hedgehog. Aus zeitlichen Gründen haben sich die diesbezüglichen Versuche der vorliegenden Arbeit fast ausschließlich auf die Selektion der Insertionen beschränkt, die für weiterführende Analysen verwendet werden können. Sowohl für das UAS-her4, wie auch für das UAS-shh Konstrukt ließen sich Insertionen finden, die bei Kreuzungen der entsprechenden Effektoren mit einem geeigneten Aktivator bedingt durch die Misexpression des Effektorgens zu Abnormalitäten bei den Nachkommen führen. Die beobachteten Phänotypen lassen sich dabei mit den vermuteten Funktionen der Effektorgene beim Wildtyp in Einklang bringen.

## 6. Literatur

- Ahmad, I., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S.** (1995). Involvement of Notch-1 in mammalian retinal neurogenesis: association of Notch-1 activity with both immature and terminally differentiated cells. *Mech. Dev.* 53, 73-85.
- Ahmad, I., Dooley, C.M., and Polk, D.L.** (1997). Delta-1 is a regulator of neurogenesis in the vertebrate retina. *Dev. Biol.* 185, 92-103.
- Allende, M. L., and Weinberg, E. S.** (1994). The expression pattern of two zebrafish *achaete-scute* homolog (*ash*) genes is altered in the embryonic brain of the *cyclops* mutant. *Dev. Biol.* 166, 509-30.
- Aono, A., Hazama, M., Notoya, K., Taketomi, S., Yamasaki, H., Tsukuda, R., Sasaki, S., and Fujisawa, Y.** (1995). Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210, 670-677.
- Appel, B., and Eisen, J. S.** (1998). Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by Delta function. *Development* 125, 371-80.
- Appel, B., Fritz, A., Westerfield, M., Grunwald, D., Eisen, J.S., and Rilley, B.B.** (1999). *Delta*-mediated specification of midline cell fates in zebrafish embryos. *Curr. Biol.* 9, 247-256.
- Argenton, F., Arava, Y., Aronheim, A., and Walker, M.D.** (1996). An activated domain of the helix-loop-helix transcription factor E2A shows cell type preference in vivo in microinjected zebrafish embryos. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1714-1721.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E.** (1995). Notch signaling. *Science* 268, 225-32.
- Bao, Z.-Z., and Cepko, C.L.** (1997). The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye. *J. Neurosci.* 17, 1425-1434.
- Barth, K.A., Kishimoto, Y., Rohr, K.B., Seydler, C., Schulte-Merker, S., and Wilson, S.W.** (1999). Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development* 126, 4977-4987.
- Basler, K., Edlund, T., Jessell, T.M., and Yamada, T.** (1993). Control of cell pattern in the neural tube: regulation of cell differentiation by *dorsalin-1*, a novel TGF beta family member. *Cell* 73, 687-702.
- Bayer, T.A., and Campos-Ortega, J.A.** (1992). A transgene containing *lacZ* is expressed in primary sensory neurons in zebrafish. *Development* 115, 421-426.
- Belecky-Adams, T., Cook, B., and Adler, R.** (1996). Correlations between terminal mitosis and differentiated fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro: analysis with the "window-labeling" technique. *Dev. Biol.* 178, 304-315.
- Bettenhausen, B., and Gossler, A.** (1995). Efficient isolation of novel mouse genes differentially expressed in early postimplantation embryos. *Genomics* 28, 436-441.
- Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J. L., and Gossler, A.** (1995). Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of *Dll1*, a murine gene closely related to *Drosophila Delta*. *Development* 121, 2407-18.
- Bierkamp, C., and Campos-Ortega, J.A.** (1993). A zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Notch* and its pattern of transcription during early embryogenesis. *Mech. Dev.* 43, 87-100.
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemont, F., and Strähle, U.** (1997). The activity of *neurogenin1* is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* 124, 4557-69.
- Boulianne, G. L., de la Concha, A., Campos-Ortega, J. A., Jan, L. Y., and Jan, Y. N.** (1991). The *Drosophila* neurogenic gene *neuralized* encodes a novel protein and is expressed in precursors of larval and adult neurons. *Embo J.* 10, 2975-83.
- Brand, A., and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brand, M., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y.J., Beuchle, D., Lun, K., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., van Eeden, F.J.M., and Nüsslein-Volhard** (1996). Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* 123, 179-190.

- Briscoe, J., Sussel, L., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T.M., Rubenstein, J.L.R., and Ericson, J.** (1999). Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398, 622-627.
- Bumcrot, D.A., Takada, R., and McMahon, A.P.** (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of Sonic hedgehog. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2294-2303.
- Cabrera, C.V., Martinez-Arias, and Bate, C.M.** (1987). The expression of three members of the *achaete-scute* gene complex correlates with neuroblast segregation in *Drosophila*. *Cell* 50, 425-433.
- Cajal, S.R.** (1893). La retina des vertebres. *La Cellule* 9, 17-257.
- Caldovic, L., and Hackett, P.B.** (1995). Development of position-independent expression vectors and their transfer into transgenic fish. *Mol. Mar. Biol. Biot.* 4, 51-61.
- Campos-Ortega, J.A.** (1993). Early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. In: Bate, C.M., Martinez-Arias, A. (eds) *Development of Drosophila*. Cold Spring Harbor Publ.
- Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., and Ezzeddine, D.** (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 589-595.
- Chang, H.** (1994). Identification of neural specific molecules in the zebrafish retina. Harvard University, Cambridge, MA.
- Chitnis, A., and Kuwada, J.** (1990). Axogenesis in the brain of zebrafish embryos. *J. Neurosci.* 10, 1892-1905.
- Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., and Kintner, C.** (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta*. *Nature* 375, 761-766.
- Chitnis, A., and Kintner, C.** (1996). Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos. *Development* 122, 2295-301.
- Coffman, C., Harris, W., and Kintner, C.** (1990). Xotch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila* notch. *Science* 249, 1438-41.
- Coffman, C.R., Skoglund, P., Harris, W.A., and Kintner, C.R.** (1993). Expression of an extracellular deletion of Xotch diverts cell fate in *Xenopus* embryos. *Cell* 73, 659-71.
- Concordet, J.P., Lewis, K.E., Moore, J.W., Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Scott, M.P., and Ingham, P.W.** (1996). Spatial regulation of a zebrafish *patched* homologue reflects the roles of *sonic hedgehog* and protein kinase A in neural tube and somite patterning. *Development* 122, 2835-2846.
- Croston, G.E., Kerrigan, L.A., Lira, L.M., Marshak, D.R., and Kadonaga, J.T.** (1991). Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science* 251, 643-649.
- Croston, G.E., Laybourn, P.J., Paranjape, S.M., and Kadonaga, J.T.** (1991). Mechanism of transcriptional antirepression by GAL4-VP16. *Genes Dev.* 6, 2270-2281.
- Culp, P.; Nüsslein-Volhard, C., and Hopkins, N.** (1991). High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7953-7957.
- Currie, P.D., and Ingham, P.W.** (1996). Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish. *Nature* 382, 452-455.
- de la Concha, A., Dietrich, U., Weigel, D. and Campos-Ortega, J.A.** (1988). Functional interactions of neurogenic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 499-508.
- Del Amo, F.F., Smith, D.E., Swiatek, P.J., Gendron-Maguire, M., Greenspan, R.J., McMahon, A.P. and Gridley, T.** (1992). Expression pattern of Motch, a mouse homolog of *Drosophila* Notch, suggests an important role in early postimplantation mouse development. *Development* 115, 737-44.
- de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J., et al.** (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124, 1139-48.
- Devoto, S.H., Melancon, E., Eisen, J.S., and Westerfield, M.** (1996). Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development* 122, 3371-80.
- Dickinson, M.E., Selleck, M.A., McMahon, A.P., and Bronner, F.M.** (1995). Dorsalization of the neural tube by the non-neural ectoderm. *Development* 121, 2099-2106.

- Doe, C.Q.** (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116, 855-63.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A.** (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Dornseifer, P., Takke, C. and Campos-Ortega, J.A.** (1997). Overexpression of a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Delta* perturbs differentiation of primary neurons and somite development. *Mech. Dev.* 63, 159-71.
- Dorsky, R.I., Rapaport, D.H., and Harris, W.A.** (1995). *Xotch* inhibits cell differentiation in the *Xenopus* retina. *Neuron* 14, 487-496.
- Dorsky, R.I., Chang, W.S., Rapaport, D.H., and Harris, W.A.** (1997). Regulation of neuronal diversity in the *Xenopus* retina by *Delta* signalling. *Nature* 385, 67-70.
- Driever, W., Stemple, D.; Schier, A., and Solnica-Krezel, L.** (1994). Zebrafisch: genetic tool for studying vertebrate development. *TIG* 10, 152-159.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A., Neuhauss, S.C.F., Malicki, J., Stemple, D., Stainier, D.Y.R., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., und Boggs, C.** (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37-46.
- Dunwoodie, S.L., Henrique, D., Harrison, S.M., and Beddington, R.S.** (1997). Mouse *Dll3*: a novel divergent *Delta* gene which may complement the function of other *Delta* homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* 124, 3065-76.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jaques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.** (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Eisen, J.S.** (1999). Patterning motorneurons in the vertebrate nervous system. *Trends Neurosci.* 22, 321-326.
- Ekker, S.C., Ungar, R.R., Greenstein, P., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Moon, R.T., and Beachy, P.A.** (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr. Biol.* 5, 944-955.
- Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., and Sklar, J.** (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649-61.
- Ericson, J., Thor, S., Edlund, T., Jessell, T.M., and Yamada, T.** (1992). Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256, 1555-60.
- Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A., and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci *Notch* and *Delta*, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523-34.
- Fietz, M.J., Jacinto, A., Taylor, A.M., Alexandre, C., and Ingham, P.W.** (1995). Secretion of the amino-terminal fragment of the hedgehog protein is necessary and sufficient for hedgehog signalling in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 5, 643-650.
- Fischer, J., Giniger, E., Maniatis, T., and Ptashne, M.** (1988). *GAL4* activates transcription in *Drosophila*. *Nature* 332, 853-856.
- Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Goridis, C. and Guillemot, F.** (1998). The bHLH protein *NEUROGENIN 2* is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20, 483-94.
- Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z.-Z., Morrow, E.M., and Cepko, C.L.** (2000). *rax*, *Hes1*, and *notch1* promote the formation of Müller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* 26, 383-394.
- Gaiano, N., Nye, J.S., and Fishell, G.** (2000). Radial glial identity is promoted by *Notch1* signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26, 395-404.
- Garrick, D., Fiering, S., Martin, D.I.K., and Whitelaw, E.** (1998). Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nature Genet.* 18, 56-59.
- Ghysen, A. and Dambly-Chaudiere, C.** (1988). From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev.* 2, 495-501.

- Ghysen, A. and Dambly-Chaudière, C.** (1989). Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet.* 5, 251-255.
- Gilbert, S.F.** (2000). *Developmental Biology*, Sixth Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Gill, G., and Ptashne, M.** (1987). Mutants of GAL4 protein altered in an activation function. *Cell* 51, 121-126.
- Giniger, E., Varnum, S., and Ptashne, M.** (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40, 767-774.
- Gossler, A., and Hrabé de Angelis, M.** (1998). Somitogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 38, 225-87.
- Goulding, M.D., Lumsden, A., and Gruss, P.** (1993). Signals from the notochord and the floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117, 1001-1016.
- Greenwald, I.** (1994). Structure/function studies of lin-12/Notch proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 556-62.
- Greenwald, I.** (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 12, 1751-62.
- Guarente, L., Yocum, R., and Gifford, P.** (1982). A GAL10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulator as an upstream site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7410-7414.
- Gupta, R., Emili, A., Pan, G., Xiao, H., Shales, M., Greenblatt, J., and Ingles, C.J.** (1996). Characterization of the interaction between the acidic activation domain of VP16 and the RNA polymerase II initiation factor TFIIB. *Nucleic Acids Res.* 24, 2324-2330.
- Gurden, J.B., Woodland, H.R., and Lingrel, J.B.** (1974). The translation of mammalian *globin* mRNA injected into fertilized eggs of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 39, 125-133.
- Haddon, C., Smithers, L., Schneider-Maunoury, S., Coche, T., Henrique, D., and Lewis, J.** (1998a). Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis. *Development* 125, 359-70.
- Haddon, C., Jiang, Y.-L., Smithers, L., and Lewis, J.** (1998b). Delta-Notch signalling and the patterning of sensory cell differentiation in the zebrafish ear: evidence from the *mind bomb* mutant. *Development* 125, 4637-4644.
- Haenlin, M., Kunisch, M., Kramatschek, B., and Campos-Ortega, J. A.** (1994). Genomic regions regulating early embryonic expression of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Mech Dev* 47, 99-110.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., van Eeden, F.J.M., Jiang, Y.j., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., and Nüsslein-Volhard, C.** (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36.
- Halloran, M.C., Sato-Maeda, M., Warren, J.T., Su, F., Lele, Z., Krone, P.H., Kuwada, J.Y., and Shoji, W.** (2000). Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development* 127, 1953-1960.
- Halpern, M.E., Hatta, K., Amacher, S.L., Talbot, W.S., Yan, Y.L., Thisse, B., Thisse, C., Postlethwait, J.H., and Kimmel, C.B.** (1997). Genetic interactions in zebrafish midline development. *Dev. Biol.* 187, 154-170.
- Hammerschmidt, M., Brook, M.J. and McMahon, A.P.** (1997). The world according to hedgehog. *Trends Genet.* 13, 14-21.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In Lover, G. M. (ed.) *DNA cloning* Vol. II, IRL Press, Oxford & Washington DC, 109-136.
- Harland, R., and Gerhart, J.** (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 611-667.
- Harris, W.A.** (1997). Cellular diversification in the vertebrate retina. *Curr. Biol.* 7, 651-658.
- Hartenstein, V., and Campos-Ortega, J.A.** (1984). Early neurogenesis in wildtype *Drosophila melanogaster*. *Roux' Arch. Dev. Biol.* 193, 308-325.
- Hartenstein, V., and Campos-Ortega, J.A.** (1985). Fate mapping in wildtype *Drosophila melanogaster* I. The pattern of embryonic cell division. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 195, 210-221.
- Hartley, D.A., Preiss, A., and Artavanis-Tsakonas, S.** (1988). A deduced gene product from the *Drosophila* neurogenic locus, *Enhancer of split*, shows homology to mammalian G-protein b subunit. *Cell* 55, 785-795.
- Harvey, R.P., and Melton, D.A.** (1988). Microinjection of synthetic *Xhox-1A* homeobox mRNA disrupts somite formation in developing *Xenopus* embryos. *Cell* 53, 687-697.

- Heitzler, P., and Simpson, P.** (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083-1092.
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C., and Simpson, P.** (1996). Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* 122, 161-71.
- Henikoff, S.** (1998). Conspiracy of silence among repeated transgenes. *BioEssays* 20, 532-535.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. and Ish-Horowicz, D.** (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick [see comments]. *Nature* 375, 787-90.
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J.** (1997). Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* 7, 661-70.
- Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., and Eguchi, G.** (1997). High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.* 192, 289-299.
- Hinz, U., Giebel, B., and Campos-Ortega, J. A.** (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* 76, 77-87.
- Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., and Kageyama, R.** (2000). Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene *Hes5* in mouse retina. *Development* 127, 2515-2522.
- Holley, S.A., Geisler, R., and Nüsslein-Volhard, C.** (2000). Control of *her1* expression during zebrafish somitogenesis by a delta-dependent oscillator and an independent wave-front activity. *Genes Dev.* 14, 1678-1690.
- Holt, C., Bertsch, T., Ellis, H., and Harris, W.A.** (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* 1, 15-26.
- Horikoshi, M., Carey, M., Kakidani, H., and Roeder, R.** (1988). Mechanism of action of a yeast activator: direct effect of GAL4 derivatives on mammalian TFIID-Promoter interactions. *Cell* 54, 665-669.
- Hu, M., and Easter, S.S.** (1999). Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev. Biol.* 207, 309-321.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Snineky, J.J., and White, T.J.** (1990). PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, inc.
- Inoue, A., Takahashi, M., Hatta, K., Hotta, Y., and Okamoto, H.** (1994). Developmental regulation of *islet-1* mRNA expression during neuronal differentiation in embryonic zebrafish. *Dev. Dyn.* 199, 1-11.
- Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R., and Guillemot, F.** (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev.* 9, 3136-3148.
- Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S., and Kageyama, R.** (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *Embo J.* 13, 1799-805.
- Jarman, A.P., Sun, Y., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.** (1995). Role of the proneural gene *atonal* in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* 121, 2019-2030.
- Jen, W. C., Wettstein, D., Turner, D., Chitnis, A., and Kintner, C.** (1997). The Notch ligand, X-Delta-2, mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* 124, 1169-78.
- Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C., and Bray, S.** (1994). The Notch signalling pathway is required for Enhancer of split bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development* 120, 3537-48.
- Jessell, T.M., and Lumsden, A.** (1997). Inductive signals and the assignment of cell fate in the spinal cord and hindbrain. In: Cowan, W.M., Jessel, T.M., and Zipursky, S.L. (eds) *Molecular and cellular approaches to neural development*. Oxford University Press.
- Jhappan, C., Gallahan, D., Stahle, C., Chu, E., Smith, G. H., Merlino, G., and Callahan, R.** (1992). Expression of an activated Notch-related *int-3* transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes Dev.* 6, 345-355.

- Jiang, Y.-L., Brand, M., Heisenberg, C.-P., Beuchle, D., Furutani-Seiki, M., Kelsh, R.N., Warga, R.M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Mullins, M.C., Odenthal, J., van Eeden, F.J.M., and Nüsslein-Volhard** (1996). Mutations affecting neurogenesis and brain morphology in the zebrafish. *Development* 123, 205-216.
- Jimenez, F., and Campos-Ortega, J. A.** (1979). A region of the *Drosophila* genome necessary for CNS development. *Nature* 282, 310-2.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cecillion, M., Marechal, E., et al.** (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383, 707-10.
- Kakidani, H., and Ptashne, M.** (1988). GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell* 52, 161-167.
- Karlstrom, R.O., Talbot, W.S., and Schier, A.F.** (1999). Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target *gli2* affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev.* 13, 388-393.
- Kim, C., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S., Huh, T., and Miki, N.** (1996). Zebrafish *elav/Hu(C)* homologue as a very early neuronal marker. *Neuroscience Lett.* 216, 109-112.
- Kimmel, C.B.** (1989). Genetics and early development of zebrafish. *TIG* 5, 283-288.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310.
- Kintner, C.** (1988). Effects of altered expression of the neural cell adhesion molecule, *N-CAM*, on early neural development in *Xenopus* embryos. *Neuron* 1, 545-555.
- Knust, E., Bremer, K.A., Vässin, H., Ziemer, A., Tepass, U., and Campos-Ortega, J.A.** (1987). The enhancer of split locus and neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 122, 262-73.
- Knust, E., Dietrich, U., Tepass, U., Bremer, K.A., Weigel, D., Vässin, H., and Campos-Ortega, J.A.** (1987). EGF homologous sequences encoded in the genome of *Drosophila melanogaster*, and their relation to neurogenic genes. *Embo J.* 6, 761-6.
- Knust, E., Schrons, H., Grawe, F., and Campos-Ortega, J.A.** (1992). Seven genes of the Enhancer of split complex of *Drosophila melanogaster* encode helix-loop-helix proteins. *Genetics* 132, 505-18.
- Kopan, R., and Weintraub, H.** (1993). Mouse notch: expression in hair follicles correlates with cell fate determination. *J. Cell Biol.* 121, 631-641.
- Kopan, R., Nye, J. S., and Weintraub, H.** (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* 120, 2385-96.
- Korzh, V., Edlund, T. and Thor, S.** (1993). Zebrafish primary neurons initiate expression of the LIM homeodomain protein *Isl-1* at the end of gastrulation. *Development* 118, 417-25.
- Kos, L., Chiang, C., and McMahon, K.A.** (1998). Mediolateral patterning of somites: multiple axial signals, including Sonic hedgehog, regulate *Nkx-3.1* expression. *Mech. Dev.* 70, 25-34.
- Kramatschek, B., and Campos-Ortega, J.A.** (1994). Neuroectodermal transcription of the *Drosophila* neurogenic genes *E(spl)* and *HLH-m5* is regulated by proneural genes. *Development* 120, 815-26.
- Krauss, S., Concordet, J.-P., and Ingham, P.W.** (1993). A functionally conserved homologue of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75, 1431-1444.
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K.** (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
- Kunisch, M., Haenlin, M., and Campos-Ortega, J.A.** (1994). Lateral inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene *delta* is enhanced by proneural proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10139-43.
- Lardelli, M., and Lendahl, U.** (1993). Motch A and motch B--two mouse Notch homologues coexpressed in a wide variety of tissues. *Exp. Cell Res.* 204, 364-72.
- Lardelli, M., Williams, R., and Lendahl, U.** (1995). *Notch*-related genes in animal development. *Int. J. Dev. Biol.* 39, 769-780.
- Larison, K.D., and BreMiller, R.** (1990). Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina. *Development* 109, 567-576.

- Lecourtois, M., and Schweisguth, F.** (1998). Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of notch in *Drosophila* embryos [In Process Citation]. *Curr. Biol.* 8, 771-4.
- Lee, J.J., von Kessler, D.P., Parks, S., and Beachy, P.A.** (1992). Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene *hedgehog*. *Cell* 71, 33-50.
- Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D., Porter, J.A., Sun, B.I., and Beachy, P.A.** (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 266, 1528-1537.
- Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N., and Weintraub, H.** (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix- loop-helix protein. *Science* 268, 836-44.
- Lehmann, R., Dietrich, U., Jiménez, F., and Campos-Ortega, J.A.** (1981). Mutations of early neurogenesis in *Drosophila*. *Roux' Arch. Dev. Biol.* 190, 226-229.
- Lewis, A.K., Frantz, G.D., Carpenter, D.A., de Sauvage, F.J., and Gao, W.-Q.** (1998). Distinct expression patterns of notch family receptors and ligands during development of the mammalian inner ear. *Mech. Dev.* 78, 159-163.
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M.W.** (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* 7, 1949-1965.
- Liem, K.F., Tremmi, G., Roelink, H., and Jessell, T.M.** (1995). Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* 82, 969-979.
- Liem, K.F., Tremmi, G., and Jessell, T.M.** (1997). A role of the roof plate and its resident TGF- $\beta$ -related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* 91, 127-138.
- Lin, S., Yang, S., and Hopkins, N.** (1994a). *lacZ* Expression in germline transgenic zebrafish can be detected in living embryos. *Dev. Biol.* 161, 77-83.
- Lin, S., Gaiano, N., Culp, P., Burns, J.C., Friedmann, T., Jiing-Kuan, Y., and Hopkins, N.** (1994b). Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science* 265, 666-669.
- Lin, Y.-S., Carey, M., Ptashne, M., and Green, M.** (1988). GAL4 derivatives function alone and synergistically with mammalian activators in vitro. *Cell* 54, 659-664.
- Long, Q., Meng, A., Wang, H., Jessen, J.R., Farrell, M.J., and Lin, S.** (1997). GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development* 124, 4105-4111.
- Lopez-Martinez, A., Chang, D.T., Chiang, C., Porter, J.A., Ros, M.A., Simandl, B.K., Beachy, P.A., and Fallon, J.F.** (1995). Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Curr. Biol.* 5, 791-796.
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J.L., and Anderson, D.J.** (1998). neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469-82.
- Malicki, J.** (1999). Development of the retina. *Methods in Cell Biology* 59, 273-299.
- Marcey, D., and Nüsslein-Vollhard, C.** (1986). Embryology goes fishing. *Nature* 321, 380-381.
- Marti, E., Brumcrot, D.A., Takada, R., and McMahon, A.P.** (1995). Requirement of a 19K Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* 375, 322-325.
- Martin, C.C., and McGowan, R.** (1995). Parent-of-origin specific effects on the methylation of a transgene in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Genetics* 17, 233-239.
- Marusich, M.F., Furneaux, H.M., Henion, P., and Weston, J.A.** (1994). Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J. Neurobiol.* 25, 143-155.
- Mikkola, I., Fjose, A., Kuwada, J.Y., Wilson, S., Guddal, P.H., and Krauss, S.** (1992). The paired domain-containing nuclear factor *pax(b)* is expressed in specific commissural interneurons in zebrafish embryos. *J. Neurobiol.* 23, 933-946.
- Morrison, S.J., Perez, S.E., Qiao, Z., Verdi, J.M., Hicks, C., Weinmaster, G., and Anderson, D.J.** (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101, 499-510.
- Morrow, E.M., Furukawa, T., Lee, J.E., and Cepko, C.L.** (1999). NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* 126, 23-36.



- Müller, H.** (1857). Anatomisch-physiologische Untersuchungen über die Retina bei Menschen und Wirbelthieren. *Z. Wiss. Zool.* 8, 1-122.
- Mullis, K.B.** (1990). The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, April 1990, 36-43.
- Nakao, K., and Campos-Ortega, J.A.** (1996). Persistent expression of genes of the enhancer of split complex suppresses neural development in *Drosophila*. *Neuron* 16, 275-86.
- Nawrocki, W.** (1985). Development of the neural retina in zebrafish, *Brachydanio rerio*. University of Oregon, Eugene, OR.
- Naya, F.J., Stellrecht, C.M., and Tsai, M.J.** (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* 9, 1009-1019.
- Nishikawa, J., Kokubo, T., Horikoshi, M., Roeder, R.G., and Nakatani, Y.** (1997). *Drosophila* TAF(II)230 and the transcriptional activator VP16 bind competitively to the TATA box-binding domain of the TATA box-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 85-90.
- Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Nye, J.S., Kopan, R., and Axel, R.** (1994). An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* 120, 2421-30.
- Odenthal, J., van Eeden, F.J.M., Haffter, P., Ingham, P.W., and Nüsslein-Volhard, C.** (2000). Two distinct cell populations in the floor plate of the zebrafish are induced by different pathways. *Dev. Biol.* 219, 350-363.
- Oellers, N., Dehio, M., and Knust, E.** (1994). bHLH proteins encoded by the Enhancer of split complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol. Gen. Genet.* 244, 465-73.
- Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C.E., and Harris, W.A.** (1999). p27<sup>Xic1</sup>, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell* 99, 499-510.
- Ornitz, D., Moreadith, R., and Leder, P.** (1991). Binary system for regulating transgene expression in mice: Targeting *int-2* gene expression with yeast *GAL4 / UAS* control elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 698-702.
- Osborn, L.R.** (2000). The fruits of the fly genome project. *Mol. Med. Today* 6, 216.
- Paroush, Z., Finley, R., Jr., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R., and Ish-Horowitz, D.** (1994). Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79, 805-15.
- Patil, J.G., Wong, V. and Khoo, H.W.** (1994). Assessment of pMTL Construct for detection *in vivo* of luciferase expression and fate of the transgene in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Zoological Science* 11, 63-68.
- Pennisi, E.** (2000). Human genome. Finally, the book of life and instructions for navigating it. *Science* 288, 2304-2307.
- Pfaff, S., and Kintner, C.** (1998). Neuronal diversification: development of motor neuron subtypes. *Curr. Biol.* 8, 27-36.
- Phi-Van, L., Kries, J., Ostertag, W., and Strätling, W.** (1990). The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol. Cell Biol.* 10, 2302-2307.
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T., and Dodd, J.** (1990). Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science* 250, 985-8.
- Plück, A.** (1996). Conditional mutagenesis in mice: the Cre/loxP recombination system. *Int. J. Exp. Path.* 77, 269-278.
- Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Frederick, W.A., and Stuart, H.O.** (1996). The T cell leukemia oncogene SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47-57.
- Porter, J.A., von Kessler, D.P., Ekker, S.C., Young, K.E., Lee, J.J., Moses, K., and Beachy, P.A.** (1995). The product of Hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 374, 363-366.
- Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A.** (1996). Cholesterol modification of hedgehog signalling proteins in animal development. *Science* 274, 255-259.

- Preiss, A., Hartley, D. A., and Artavanis-Tsakonas, S.** (1988). The molecular genetics of Enhancer of split, a gene required for embryonic neural development in *Drosophila*. *Embo J.* 7, 3917-27.
- Raymond, P., Barthel, L., and Curran, G.** (1995). Developmental patterning of rod and cone photoreceptors in embryonic zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 359, 537-550.
- Raz, E., van Luenen, H., Schaerringer, B., Plasterk, R.H.A., and Driever, W.** (1997). Transposition of the nematode *Caenorhabditis elegans* *Tc3* element in the zebrafish *Danio rerio*. *Curr. Biol.* 8, 82-88.
- Reaume, A.G., Conlon, R.A., Zirngibl, R., Yamaguchi, T.P., and Rossant, J.** (1992). Expression analysis of a Notch homologue in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 154, 377-87.
- Rebay, I., Fehon, R.G., and Artavanis-Tsakonas, S.** (1993). Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell* 74, 319-29.
- Riley, B.B., Chiang, M.-Y., Farmer, L., and Heck, R.** (1999). The *deltaA* gene of zebrafish mediates lateral inhibition of hair cells in the inner ear and is regulated by *pax2.1*. *Development* 126, 5669-5678.
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T. and Jessell, T.M.** (1995). Floor plate and motor neuron induction by *vhh-1*, a vertebrate homolog of *hedgehog* expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.
- Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A., and Jessell, T.M.** (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of amino terminal cleavage product of Sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445-455.
- Rossant, J., and Hopkins, N.** (1992). Of fin and fur: mutational analysis of vertebrate embryonic development. *Genes Dev.* 6, 1-13.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., and Ptashne, M.** (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.
- Schauerte, H.E., van Eeden, F.J., Fricke, C., Odenthal, J., Strähle, U., and Hafter, P.** (1998). Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish. *Development* 125, 2983-2993.
- Scheer, N.** (1996). Versuche zur Etablierung des GAL4-Systems im Zebrafisch (*Danio rerio*). Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Scheer, N., and Campos-Ortega, J.A.** (1999). Use of the GAL4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech. Dev.* 80, 153-158.
- Schier, A.F., Neuhauss, S.C.F., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D.Y.R., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Stemple, D.L., Rangini, Z., Yang, H., and Driever, W.** (1996). Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development* 123, 165-178.
- Schmitt, E.A., and Dowling, J.E.** (1996). Comparison of topographical patterns of ganglion and photoreceptor cell differentiation in the retina of the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Comp. Neurol.* 371, 222-234.
- Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., and Kopan, R.** (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-6.
- Schrons, H., Knust, E., and Campos-Ortega, J.A.** (1992). The Enhancer of split complex and adjacent genes in the 96F region of *Drosophila melanogaster* are required for segregation of neural and epidermal progenitor cells. *Genetics* 132, 481-503.
- Schweisguth, F., and Posakony, J.W.** (1992). Suppressor of Hairless, the *Drosophila* homolog of the mouse recombination signal-binding protein gene, controls sensory organ cell fates. *Cell* 69, 1199-212.
- Singson, A., Leviten, M.W., Bang, A.G., Hua, X.H., and Posakony, J.W.** (1994). Direct downstream targets of proneural activators in the imaginal disc include genes involved in lateral inhibitory signaling. *Genes Dev.* 8, 2058-2071.
- Smithers, L., Haddon, C., Jiang, Y.-J., and Lewis, J.** (2000). Sequence and embryonic expression of *deltaC* in the zebrafish. *Mech. Dev.* 90, 119-123.
- Smoller, D., Friedel, C., Schmid, A., Bettler, D. Lam, L., and Yedvobnik, B.** (1990). The *Drosophila* gene *mastermind* encodes a nuclear protein unusually rich in amino acid homopolymers. *Genes Dev.* 4, 1688-1700.
- Struhl, G., and Basler, K.** (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72, 527-40.

- Stuart, G.W., McMurray, J.V., and Westerfield, M.** (1988). Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103, 403-412.
- Stuart, G.W., Vielkind, J.R., McMurray, J.V., and Westerfield, M.** (1990). Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Development* 109, 577-584.
- Sulston, J.E., and Horvitz, H.R.** (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 82, 41-55.
- Sulston, J.E., and Horvitz, H.R.** (1981). Abnormal cell lineages in mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56, 110-156.
- Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J., and Thomson, N.** (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100, 64-119.
- Takke, C., Dornseifer, P., von Weizäcker, E., and Campos-Ortega, J.A.** (1999). *her4*, a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *E(spl)*, is a target of NOTCH signalling. *Development* 126, 1811-1821.
- Takke, C., and Campos-Ortega, J.A.** (1999). *her1*, a zebrafish pair-rule like gene, acts downstream of notch signalling to control somite development. *Development* 126, 3005-3014.
- Tanabe, Y., Roelink, H., and Jessell, T.M.** (1995). Induction of motor neurons by Sonic hedgehog is independent of floor plate differentiation. *Curr. Biol.* 5, 651-658.
- Tanabe, Y., and Jessell, T.M.** (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274, 1115-1123.
- Tata, F., and Hartley, D.A.** (1995). Inhibition of cell fate in *Drosophila* by Enhancer of split genes. *Mech. Dev.* 51, 305-15.
- Tax, F. E., and Thomas, J. H.** (1994). Cell-cell interactions. Receiving signals in the nematode embryo. *Curr. Biol.* 4, 914-6.
- Technau, G.M., and Campos-Ortega, J.A.** (1985). Fate mapping in wildtype *Drosophila melanogaster* II. Interactions of horseradish peroxidase in cells of the early gastrula stage. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194, 196-212.
- Teillet, M.A., Lapointe, F., and Le Dourain, N.M.** (1998). The relationships between notochord and floor plate in vertebrate development revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS* 95, 11733-11738.
- Thisse, C., and Thisse, B.** (1999). Activin, a novel and divergent member of the TGF- $\beta$  superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* 126, 229-240.
- Thomas, K.R., and Cappechi, M.R.** (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Tomita, K., Ishibashi, M., Nakahara, K., And, S.L., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R.** (1996). Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. *Neuron* 16, 723-734.
- Trevarrow, B., Marks, D., and Kimmel, C.** (1990). Organisation of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* 4, 669-679.
- Turner, D.L., and Cepko, C.L.** (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-136.
- Turner, D.L., and Weintraub, H.** (1994). Expression of *achaete-scute* homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev.* 8, 1434-1447.
- van Eeden, F.J.M., Granato, M., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y.-J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., Warga, R.M., Allende, M.L., Weinberg, E.S., and Nüsslein-Volhard, C.** (1996). Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 153-164.
- Weinberg, E.S., Allende, M.L., Kelly, C.S., Abdelhamid, A., Murakami, T., Andermann, P., Doerre, O.G., Grunwald, D.J., and Riggleman, B.** (1996). Developmental regulation of zebrafish *myoD* in wild-type, no tail and spadetail embryos. *Development* 122, 271-280.
- Weinmaster, G., Roberts, V.J., and Lemke, G.** (1991). A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development. *Development* 113, 199-205.
- Weinmaster, G., Roberts, V.J., and Lemke, G.** (1992). Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116, 931-41.

- Westerfield, M.** (1993). A guide for laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). The Zebrafish Book. Oregon University Press, Oregon.
- Westin, J., and Lardelli, M.** (1997). Three novel Notch genes in zebrafish: implications for vertebrate Notch gene evolution and function. *Dev. Genes Evol.* 207, 51-63.
- Wetts, R., and Fraser, S.E.** (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* 239, 1142-1145.
- Wettstein, D.A., Turner, D.L., and Kintner, C.** (1997). The *Xenopus* homolog of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development* 124, 693-702.
- Whitfield, T.T., Granato, M., van Eeden, F.J.M., Schach, U., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y.-J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., and Nüsslein-Volhard, C.** (1996). Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* 123, 241-254.
- Williams, R., Lendahl, U., and Lardelli, M.** (1995). Complementary and combinatorial patterns of Notch gene family expression during early mouse development. *Mech. Dev.* 53, 357-68.
- Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J. and Jessell, T.M.** (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635-47.
- Yamada, T., Pfaff, S.L., Edlund, T. and Jessell, T.M.** (1993). Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* 73, 673-86.
- Young, R.W.** (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* 212, 199-205.

## 7. Anhang

Konstrukt	Insertion Nr. (F <sub>0</sub> )	Zahl getesteter F <sub>1</sub> -Nachkommen	Zahl transgener F <sub>1</sub> -Nachkommen (Keimbahntransmissionsrate)
cmvtk-GAL4	23	36	1 (3 %)
	24	33	2 (6 %)
	60	19	2 (11 %)
	92	44	1 (2 %)
svtk-GAL4	16	49	2 (4 %)
	73	77	7 (9 %)
carp β-actin-GAL4	6	20	4 (20 %)
	68	11	5 (45 %)
	80	22	2 (9 %)
	90	22	2 (9 %)
	95	22	5 (23 %)
2MAR carp β-actin-GAL4	18	10	3 (30 %)
ef1 <sub>-</sub> -GAL4	3	90	1 (1 %)
	10	24	7 (29 %)
	110	19	8 (42 %)
	118	10	3 (30 %)
	131	10	3 (30 %)
	154	13	2 (15 %)
hsp-GAL4	6	9	1 (11 %)
	13	47	1 (2 %)
	15	15	3 (20 %)
hsp-GALAD1	2	40	4 (10 %)
	14	20	1 (5 %)
deltaD-GAL4	28	8	3 (38 %)
	38	13	1 (8 %)
	58	36	8 (22 %)
	78	14	3 (21 %)
	106	9	3 (33 %)
UAS-mycNIC	5	11	2 (18 %)
	19	20	2 (10 %)
	34	19	4 (21 %)
	73	22	1 (5 %)
UAS-her4	2	10	5 (50 %)
	13	24	2 (8 %)
	36	10	3 (30 %)
	50	14	6 (43 %)
	56	7	2 (29 %)
	61	10	1 (10 %)
	77	24	1 (4 %)
UAS-shh	7	20	1 (5 %)
	8	28	2 (7 %)
	36	12	1 (8 %)
	47	24	3 (13 %)
	63	58	1 (2 %)
UAS-lacZ	18	51	2 (4 %)
	27	39	1 (3 %)
	39	24	13 (54 %)
	51	21	2 (10 %)
UAS-gfp	9	10	3 (30 %)
	29	10	4 (40 %)
	30	11	5 (45 %)
	31	10	2 (20 %)
	43	12	4 (33 %)
	47	22	1 (5 %)
	61	20	2 (10 %)

**Tabelle 7.1:** Auflistung der transgenen F<sub>1</sub>-Nachkommen aller getesteter Gründerfische (F<sub>0</sub>). Die Keimbahntransmissionsrate - der Anteil transgenen Nachkommen an der gesamten Nachkommenschaft - der unterschiedlichen Gründerfische liegt zwischen den Werten von 1 und 54 %.

Konstrukt	<i>gal4</i> -Expressionsdomänen	allgemeine Expressionsstärke	relative Expressionsstärke unterschiedlicher Insertionen
cmvtk-GAL4	otische Plakode; nicht identifizierte Zellen im Rückenmark	sehr schwach	n.b.
svtk-GAL4	Hinterhirn; Hüllschicht	schwach	16<73
(2MAR) carp $\beta$ -actin-GAL4	adaxiales Mesoderm; Hinterhirn	schwach	6<18/95<68<90
ef1_-GAL4	ubiquitär, am stärksten in den Augen, im Gehirn und in den Somiten	schwach	154<118<131<110<10<3
hsp-GAL4/GALAD1	ubiquitär nach Hitzeschock	sehr stark nach Hitzeschock	n.b.
deltaD-GAL4	Schwanzknospe; präsomitisches und somitisches Mesoderm; verschiedene neurogene Regionen	schwach - stark	28<106<38<78<58

**Tabelle 7.2:** Grobe Beschreibung der Expression und der allgemeinen Expressionsstärke der *gal4*-RNA bei den Transgenen mit unterschiedlichen Konstrukten und Verhältnis der Expressionsstärke bei unabhängigen Insertionen mit einem Konstrukt. n.b. = nicht bestimmt

Konstrukt	verwendeter Aktivator	Methode zum Nachweis auf Transaktivierbarkeit	transaktivierbare Insertionen	nicht transaktivierbare Insertionen
UAS-mycNIC	dID-GAL4	Myc-AK-Färbung	5,19,34,73	-
UAS-gfp	hsp-GALAD1	Fluoreszenz / <i>gfp in situ</i>	61	2,29,31,43,47
UAS-lacZ	dID-GAL4	<i>lacZ in situ</i> / X-Gal-Färbung	27,51	18,39,(27,51)
UAS-shh	hsp-GAL4	<i>shh in situ</i>	7,8,36,47,63	-
UAS-her4	hsp-GAL4	<i>her4 in situ</i>	(2),36,56	13,61

**Tabelle 7.3:** Test der unterschiedlichen Effektoren auf Transaktivierbarkeit. Die zur Transaktivierung verwendeten Aktivatoren und die Methode zum Nachweis der Transaktivierbarkeit sind angegeben. Die UAS-lacZ Insertionen Nr. 27 und 51 sind in beiden Kategorien aufgelistet, da sie je nach der verwendeten Nachweismethode als transaktivierbar (*lacZ in situ*) bzw. nicht transaktivierbar (X-Gal-Färbung) erschienen.

Kreuzung	hsp-Aktivator x NIC-Effektor	hsp-Aktivator x NIC-Effektor	dID-Aktivator x NIC-Effektor	dID-Aktivator x NIC-Effektor	hsp-Aktivator x NIC-Effektor
Alter des Embryos zum Zeitpunkt des Hitzeschocks	30 Stunden	30 Stunden	kein Hitzeschock	kein Hitzeschock	30 Stunden
Alter des Embryos bei der Fixierung	47 Stunden	47 Stunden	3 Tage	3 Tage	3 Tage
Phänotyp des Embryos	wildtypisch	mutant	wildtypisch	mutant	mutant
Zahl der H3- positiven Zellen pro untersuchtem Auge	581	72	425	205	50
	575	70	344	177	57
	492	80	347	192	85
	505	74	405	115	79
			316		
			264		
			418		
			424		
Summe	2153	296	2943	689	271
Mittelwert	538	74	368	172	68
Standardabweichung	46	4	60	40	17

**Tabelle 7.4:** Auswirkung der Expression von aktiviertem Notch auf das Proliferationsverhalten von Zellen in der Retina, untersucht mit dem H3-Antikörper. Ein heterozygoter hsp- bzw. dID-Aktivator wurde mit einem heterozygoten NIC-Effektor gekreuzt, und die Embryonen im Falle der Kreuzung mit dem hsp-Aktivator mit 30 Stunden hitzegeschockt. Mutante und wildtypische Embryonen aus diesen Kreuzungen wurden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert, einer H3-Antikörperfärbung unterzogen und die Augen geschnitten. Die H3-positiven Zellen der Retina aller Schnitte eines Auges wurden gezählt.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega betreut worden.

Teilpublikationen:

Scheer, N., and Campos-Ortega, J.A. (1999). Use of the GAL4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech. Dev.* 80, 153-158.



## Lebenslauf

---

**Name:** Nico Scheer, geb. Steinwartz

**Geburtsdatum/-ort:** 11.07.1968 in Mönchengladbach

**Schulbildung:**

1975-1979 Katholische Grundschule Engelsholt  
1979-1988 Städtisches Gymnasium Mönchengladbach/Rheindalen  
1988 Abitur

**Zivildienst:**

1988–1990 Rheinische Schule für Körperbehinderte in Mönchengladbach

**Studium:**

1990-1992 Grundstudium der Biologie an der Universität zu Köln  
1992 Vordiplom  
1992-1995 Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln  
1995 Diplomprüfung in den Fächern:  
Entwicklungsbiologie (Hauptfach), Biochemie und Genetik  
1995-1996 Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln mit dem Titel:  
„Versuche zur Etablierung des GAL4-Systems im Zebrafisch (*Danio rerio*)“

**Promotion:**

1996-2000 Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln

**Berufliche Tätigkeit:**

1995-1996 Studentische Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln  
1996-1997 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln  
seit 1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln

Köln, September 2000